

**Untersuchungen zur
Probenentnahme bei der Diagnostik
entzündlicher Euterkrankheiten**

Peter Mühlhäusler

1967

Aus dem Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf
Vorstand: Professor Dr. K. Dedie

vorgelegt über die Gynäkologische und Ambulatorische Tier-
klinik der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Baier

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROBENENTNAHME BEI DER DIAGNOSTIK
ENTZÜNDLICHER EUTERKRANKHEITEN

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Peter M ü h l h ä u s l e r
Tierarzt aus Chemnitz

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. A. Herrlich

Referent Prof. Dr. W. Baier

Tag der Promotion: 28. 7. 1967



STUNDENPLAN

MEINEN LIEBEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1. Die Euterentzündung des Rindes	3
2.1.1. Allgemeines zur Mastitis	3
2.1.2. Zur Diagnostik der Euterentzündung	5
2.1.2.1. Zytologische Untersuchungen	5
2.1.2.2. Untersuchungen durch Schnellmethoden	6
2.1.2.3. Bakteriologische Untersuchung	10
2.2. Anfangs- und Endgemelk in der unterschiedlichen Bewertung zur Diagnose von Euterkrankheiten	11
2.2.1. Zellgehalt	11
2.2.2. Euterpathogene Mikroorganismen	12
2.2.3. Schalmprobe	13
2.2.4. Gemelke in der Zwischenmelkzeit	13
2.3. Milchprobenentnahme	13
2.4. Einfluß der Temperatur auf die Beschaffenheit der Milchprobe	16
2.4.1. Einfluß auf das Keimwachstum	16
2.4.2. Einfluß auf die Schalmprobe	17
2.5. Konservierungsmittel als Zusatz bei Milchproben	18
3. Problemstellung	19
4. Eigene Versuche	21
4.1. Untersuchungsmaterial und Methodik	21
4.1.1. Herkunft der Proben und Probenentnahme	21
4.1.2. Bakteriologische Untersuchung	22
4.1.3. Zellzahlbestimmung nach Prescott und Breed	24
4.1.4. Zellgehaltsbestimmung im Sediment	25

	Seite
4.1.5. Schalmprobe	25
4.1.6. Untersuchung der Gemelksfraktionen	26
4.1.7. Probenentnahme mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze	27
4.1.8. Untersuchungen über den Einfluß der Lage- rungstemperatur, Lagerungszeit und des Zusatzes von Konservierungsmitteln auf die bakteriologische Diagnose und die Schalmprobe	28
4.2. Vorversuche	29
4.2.1. Abhängigkeit des bakteriologischen Befundes von einer Euterwaschung	29
4.2.2. Einfluß von Schüttelbewegung während des Transportes auf die Schalmreaktion bei kleiner und großer Milchmenge	31
4.2.3. Keimvermehrung bei verschiedenen Tempera- turen in kleiner und großer Milchmenge	36
4.2.4. Zur Beurteilung nicht eindeutig bakteriolo- gischer Befunde	36
4.2.5. Folgerungen aus den Vorversuchen	38
4.3. Hauptversuche	39
4.3.1. Untersuchung der Gemelksfraktionen	39
4.3.1.1. Zellgehalt	39
4.3.1.2. Schalmprobe	40
4.3.1.3. Keimgehalt	49
4.3.1.4. Verhalten von Keim- und Zell- gehalt sowie der Schalmprobe in Melk- und Zwischenmelkzeit	52
4.3.2. Probenentnahme mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze	53
4.3.3. Untersuchungen über den Einfluß der Lage- rungstemperatur, Lagerungszeit und des Zusatzes von Konservierungsmitteln auf den bakteriologischen Befund und die Schalmprobe	60

	Seite
4.3.3.1. Bakteriologischer Befund	60
4.3.3.2. Schalmprobe	64
5. Besprechung der Ergebnisse	
5.1. Einfluß der Gemelksfraktionen	71
5.2. Probenentnahme mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze	73
5.3. Einfluß von Lagerungszeit, Lagerungstemperatur und dem Zusatz von Konservierungsmitteln auf den bakteriologischen Befund und die Schalmprobe	74
5.4. Empfehlungen zur Milchprobenentnahme	75
6. Zusammenfassung	77
7. Literaturverzeichnis	79

1. EINLEITUNG

In allen Ländern mit intensiver Milchviehhaltung nimmt die Milchwirtschaft eine der wichtigsten Positionen in der Volksernährung ein. Mit der dabei notwendig werdenden Intensivierung der Milchviehzucht, Rationalisierung und Mechanisierung der Milchgewinnung ist heute ein konstantes Ansteigen der Mastitiden zu beobachten. STABLEFORTH (69) spricht von 20 - 30 % der Tiere, die mit euterpathogenen Mikroorganismen behaftet sind.

In der Molkereiwirtschaft treten bei der Verarbeitung von Milch, der Mastitissekret beigemischt ist, Qualitätsminderungen bei Milchprodukten ein. Diese wirken sich stark auf die Wettbewerbsfähigkeit der milchverarbeitenden Industrie aus.

Für die Milchviehhaltung erhält die Mastitis insofern Bedeutung, als euterkrankte Kühe herabgesetzte Leistungen zeigen, nach STABLEFORTH (69) ein durchschnittlicher Leistungsrückgang von 12 %, und außerdem ihre Lebenserwartungen niedriger sind. Nicht zuletzt kann dem Verbraucher aus hygienischen Gründen der Verzehr von Milch euterkranker Kühe nicht zugemutet werden. Die Bekämpfung der Mastitiden ist insofern eine milchwirtschaftliche, landwirtschaftliche und milchhygienische Aufgabe.

In zunehmendem Maße werden in milchwirtschaftlich orientierten Ländern Eutergesundheitsdienste eingerichtet und der Gehalt an Entzündungsprodukten in die Gütebewertung eingebaut. Für eine wirksame Arbeit der Eutergesundheitsdienste ist es notwendig, Aussagen darüber zu machen, welche Kühe in welchem Grade an Euterentzündungen erkrankt sind. Da die hierfür notwendigen Untersuchungen von Milchproben einmal die Grundlage eines Eutergesundheitsdienstes sind, zum anderen jedoch der Aussagewert einer Laboruntersuchung stark durch Fehler bei der Probenentnahmetechnik beeinflusst werden kann, dürfen bei der Probenentnahme nur optimale Methoden angewendet werden.

Meine Aufgabe war es, zu überprüfen, inwieweit die Technik der Probenentnahme, sowie die Weiterbehandlung bei Transport und Aufbewahrung der Proben einen Einfluß auf den Aussagewert der Laboratoriumsdiagnose ausüben.

2. SCHRIFTTUM

2. 1. Die Euterentzündung des Rindes

2.1.1. Allgemeines zur Mastitis

Die Euterentzündung des Rindes verläuft in akuter sowie in chronischer Form, wobei klinische Entzündungssymptome bei der akuten Form meist deutlicher ausgeprägt sind als bei der chronischen und nicht selten mit Störungen des Allgemeinbefindens einhergehen. DIERNHOFER (10) sowie HEIDRICH und RENK (20) teilen die Mastitiden auf Grund der pathologisch-anatomischen und bakteriologischen Befunde, sowie des Krankheitsverlaufs und der Sekretbeschaffenheit ein. Sie unterscheiden zwischen akuter und chronischer katarrhalischer Galaktophoritis und Mastitis, hauptsächlich durch Bakterien der Familie Micrococaceae verursacht, und den spezifischen Mastitisformen, die durch Brucellen, Actinomyceten, Blastomyceten und anderen hervorgerufen werden können.

KÄSTLI (24) und KÄSTLI und BINZ (27) bezeichnen als Euterkatarrh eine chronisch-entzündliche Sekretionsstörung, die nicht durch Galtestreptokokken verursacht wird. Sie konnten bei einem Drittel der Fälle von Euterkatarrh keine bakteriologische Ursache beobachten und prägten für diese Fälle den Begriff "aseptischer Euterkatarrh" (25). DEDIE und KIELWEIN (9) weisen ebenfalls auf den großen Anteil sekretorischer Störungen ohne bakteriellen Befund hin. ZEIDLER (76) definiert die Mastitis wie folgt: Der Schwellenwert für die obere Grenze der Norm liegt bei unter 500 000 Zellen pro ml Milch. Als latente Infektion bezeichnet ZEIDLER den Zustand, bei dem dieser Schwellenwert nicht überschritten wird und euterpathogene Mikroorganismen nachgewiesen werden. Fehlen letztere, und liegen über 500 000 Zellen pro ml Milch vor, so handelt es sich um eine Sekretionsstörung. Von einer Mastitis spricht ZEIDLER, wenn die Zellzahl über dem Schwellenwert liegt und euterpathogene Mikroorganismen nachgewiesen werden. KÄSTLI (26) gab neuerdings in Übereinstimmung mit der Weltliteratur den Begriff Euterkatarrh auf und bezeichnete

jetzt jede entzündliche Eutererkrankung als Mastitis.

Stehen bei der akuten Euterentzündung Ödeme des hyperämischen Interstitiums im Vordergrund, so sind für die chronische Form entzündliche Zellproliferationen charakteristisch, die mit Zunahme des interstitiellen Bindegewebes und Rückbildung der Alveolen einhergehen. In beiden Fällen mischt sich die Blutflüssigkeit mit mehr oder weniger starkem Zellgehalt (besonders polymorphkernige Leukozyten) dem physiologischen Milchsekret bei (KITZ (33)).

Auch die chemische Zusammensetzung des Milchsekrets ändert sich. Während bei chronischen Prozessen nur der Globulingehalt über die physiologischen Werte steigt, weist Mastitissekret einer akuten Entzündung eine Erhöhung, sowohl im Globulin- als auch im Albumingehalt auf (HEIDRICH und RENK (20)). Andere chemisch-physikalische Eigenschaften, wie die Werte für elektrische Leitfähigkeit, Chlorgehalt, Alkalität und Katalasegehalt sind ebenfalls erhöht. Das Sekret der akuten Mastitis erhält durch die Beimischung der Entzündungsprodukte einen serösen, schleimigen, blutigen, eitrigen oder fibrinösen Charakter. Tritt damit im akuten Verlauf eine sinnfällige Veränderung des Milchsekrets auf, so ist dies in chronischen Fällen nur selten der Fall. Auch die klinischen Veränderungen sind in chronischen Fällen nur begrenzt festzustellen.

KIELWEIN und HARR (32) unterschieden bisher zwischen einer chronisch-katarrhalischen Mastitis in engerem Sinn mit sinnfälliger Sekretveränderung und klinischen Veränderungen, sowie dem Euterkatarrh, bei dem diese Begleiterscheinungen nicht zu bemerken sind und der ohne Beteiligung von Mastitisserregern als nicht infizierter Euterkatarrh bezeichnet wird. Dem internationalen Gebrauch Rechnung tragend, wollen auch sie, wie KÄSTLI (25), auf den Begriff Euterkatarrh verzichten und nur zwischen Mastitis in engerem Sinn und latenter Mastitis unterscheiden.

Aus Mastitissekret wurde schon eine große Zahl pathogener und auch saprophytärer Keime isoliert.

JENRICH (23) stellt im Württembergischen Oberland fest, daß von der Gesamtsumme der infizierten Euterviertel mit 56,1 % fast die Hälfte aller Bakterien auf Mikrokokken fällt. Es folgen mit 18,8 % die Staphy-

lokokken und mit 12,7 % die Streptokokken.

Weiterhin wurde in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit von JENRICH coliforme Keime, Corynebakterien, Pseudomonaden und Proteusbakterien gefunden. Außerdem konnten Clostridien, Salmonellen, Pasteurellen, Hefen und Viren aus Mastitissekret isoliert werden (KIELWEIN (30)).

2.1.2. Zur Diagnostik der Euterentzündung

Von der großen Zahl der Untersuchungsmethoden, die zur Diagnostik von Mastitiden und Sekretionsstörungen entwickelt wurde, sollen die gebräuchlichsten im folgenden kurz erwähnt werden.

Im Zusammenhang mit der klinischen Untersuchung erwies sich die Prüfung der Milch in der schwarzen Testschale auf grobsinnlich wahrnehmbare Veränderungen als einfachste Untersuchungsmethode. Daneben ist die Katalase-Thymbromol-Probe sowie die pH-Messung durch ein Indikatorpapier ebenfalls im Stall durchführbar. Von den diagnostischen Untersuchungen im Laboratorium sollen die Methoden zur Feststellung von chemisch-physikalischen Werten, wie Messung der elektrischen Leitfähigkeit und die Chlorgehaltsbestimmung nur erwähnt werden, da sie heute von untergeordneter Bedeutung geworden sind.

2.1.2.1. Zytologische Untersuchungen

Der Zellbefund ist nach SEELEMANN (65) einer der wichtigsten Kriterien für die Gesundheit der Milchdrüse und damit der Milchbeschaffenheit. SEELEMANN und MEYER (66) betonen, daß jeder Reiz, der auf das Eutergewebe einwirkt, in einer Erhöhung des Zellgehaltes seinen Ausdruck findet. HAUKE (17) weist auf die sehr unterschiedlichen Angaben in der Literatur hin. Nach KIELWEIN (30) hat normale Milch einen Zellgehalt unter 150 000/ml; ein Zellgehalt zwischen 150 000 und 300 000/ml kann, ein solchervon über 300 000/ml muß als Zeichen einer Sekretionsstörung gewertet werden. ZEIDLER (76) gibt den Zellzahlgrenzwert für normale Milch im Anfangsgemelk mit $\leq$ 500 000 Zellen pro ml an.

Eine sehr grobe Bestimmungsmethode stellt die TROMMSDORFF'sche Leukozytenprobe (74) dar, die nach OBIGER (48) wegen verschiedener Mängel

mit einer mikroskopischen Untersuchung des Zentrifugats verbunden werden muß.

Im "Kieler Verfahren" nach SEELEMANN (64) wird eine Zellzahl-schätzung durch mikroskopische Untersuchung angewandt. Hierbei entspricht nach den Angaben von DEDIÉ und KIELWEIN (9) der Nachweis von einer Zelle pro Gesichtsfeld (Objektiv 100, Okular 8 x) einem Gehalt von 25 000 Zellen pro ml Milch. Sie stellten fest, daß erfahrungsgemäß bei mehr als 5 Zellen pro Gesichtsfeld der Verdacht auf eine Sekretionsstörung besteht.

Zur quantitativen Bestimmung wurde einmal das Verfahren nach DOANE und BUCKLEY (zit. nach HAUKE (17)) in der Zählkammer entwickelt. Am häufigsten findet jedoch die Zellzählung nach PRESCOTT und BREED Verwendung. LEIDL, SCHALM und LÜPS (38) zeigen, daß die Fehlergrenze der Zellzahlbestimmung nach dieser Methode mit steigender Zellzahl zunimmt, halten sie aber zur Beurteilung der Milch für geeignet. Die von ihnen angewandte Färbung nach BROADHURST ermöglicht eine Differenzierung in Gesamtzellgehalt und Leukozytengehalt was von großem diagnostischem Wert ist.

In Anlehnung an die hämatologische Leukose-Diagnostik entwickelten PHIPPS und NEWBOULD (51) sowie CULLEN (7) ein Verfahren den Zellgehalt aus resuspendiertem Milchsediment zu bestimmen. TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (73) ermitteln direkt in Nativmilch elektronisch den Zellgehalt. Hierbei wird die Milchprobe einer chemischen Präparation unterzogen, wobei Alkylphenolpolyglykoläther als Emulgator Verwendung findet.

2.1.2.2. Untersuchungen durch Schnellmethoden

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Schnellmethoden zur Feststellung von Sekretionsstörungen entwickelt; nach SEELEMANN (65) sind drei Verfahren besonders bekannt geworden:

1. die Whitesideprobe,
2. die Antiforminprobe,
3. der Kalifornia-Mastitis-Test oder die Schalmprobe.

Die von Whiteside 1939 beschriebene Probe mit Natronlauge wurde von KÄSTLI (Laugenprobe) modifiziert (zit. nach HARR (16)).

Die Antiforminprobe gleicht im Prinzip der Whitesideprobe. Über ihren Wert für die Diagnose der Mastitis berichteten NEGRETTI und Mitarbeiter (43).

Beide Methoden sind nach SEELEMANN (65) in der Anzeige leichter Reizzustände der Schalmprobe gegenüber unterlegen.

Seit den Veröffentlichungen von SCHALM und Mitarbeiter 1957 (56) und 1960 (55) ist der Kalifornia- Mastitis-Test von zahlreichen Untersuchern eingehend geprüft und diskutiert worden. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf dem Vermögen anionen-aktiver Detergentien, die Beschaffenheit der Milch aus sekretionsgestörten Eutern sichtbar zu verändern. SCHALM verwendet eine Kunststoffplatte, in deren Schalen die Milch der einzelnen Euterviertel eingemolken wird. Bei den von DEDIÉ und KIELWEIN (9) vorgeschlagenen Verfahren, die Schalmprobe im Agglutinationsröhrchen durchzuführen, kann der Grad der Reaktion genauer als in der Schale beurteilt werden.

Außerdem erwies sich die Methode, wie SCHOBER, CHRIST und PRINZ (60) bestätigen, als besonders geeignet für die Unterscheidung geringgradiger Reaktionen.

SCHALM (55) erklärt die Reaktion seiner Probe damit, daß Detergentien bei Anwesenheit von Proteinen zellulären Ursprungs sichtbare Veränderungen ihrer Beschaffenheit zeigen.

JAARTSVELD (22) brachte die im Zellkern enthaltene Desoxyribonukleinsäure mit der bei leukozytenreicher Milch eintretenden Viskositätsänderung in ursächlichen Zusammenhang. CARROLL und SCHALM (5) erzielten bei der Behandlung schalmpositiver Milch mit Desoxyribonuklease einen Rückgang der Reaktion.

DEDIÉ und KIELWEIN (9) sind der Ansicht, daß die Zellen nicht die alleinigen Träger der Reaktion sind. Ihre Versuche deuten darauf hin, daß oberflächenaktive Stoffe auf eine lösliche Eiweißkomponente ansprechen, die formalin- und wärmeempfindlich ist.

OBIGER (49) versuchte die Abhängigkeit der Schalm-Reaktion von dem

Stoffwechsel und den biophysikalischen Lebensvorgängen der Zellen zu demonstrieren. Er ging von der Vorstellung aus, daß bei der Schalm-Reaktion sich anionisch-oberflächenaktive Stoffe an die entgegengesetzt geladene Oberfläche der Blutkörperchen in der Milch anlagern. In diesem Zusammenhang weist OBIGER darauf hin, daß bakterielles Wachstum nicht ohne Einfluß auf die Schalmreaktion sein kann. Nach seiner Meinung führt das ungleiche und wechselnde Wachstum der Bakterienarten zu verschiedener Stärke des elektrochemischen Potentials und der Oberflächenspannung.

CHRIST (6) und SCHOBER, CHRIST und PRINZ (60) stellten eine große Empfindlichkeit des Kalifornia-positiven Systems gegenüber Temperaturänderungen, Wasserentzug und organischen Lösungsmitteln fest. Sie schlossen, daß es sich bei der Kalifornia-Reaktion um die Denaturierung eines Protein-Lipid-Komplexes handeln müsse. Wesentlich für die Reaktion erscheint den Autoren die Detergens enthaltende anionische Schwefelsäuregruppe in direkter oder intermediärer Bindung zu sein. Bei den Versuchen mit ansaurer Milch zeigen diese Proben bei Detergenszusatz zwar eine Fällung, deren schleimiger Zustand aber erst nach Neutralisation mit Lauge eintritt. Dies deuten die Autoren dahingehend, daß die Wahl des pH-Milieus entscheidet, ob Proteinlösungen auf Detergenszusatz, Proteinfällungen oder Protein-Detergens-Komplexe in löslicher Form ausbilden. Da Heparin und Desoxycholatlösungen die gleiche Wirkung wie Detergentien zeigen, wird geschlossen, daß die Lipidananteile im wirksamen Prinzip ebenso wesentlich wie der Proteinanteil sein müssen. Die Schwierigkeiten, die sich bei einer Isolierung des wirksamen Prinzips entgegenstellen, beruhen auf dem labilen, komplexen System, das nur im nativen Zustand zur Kalifornia-Reaktion befähigt ist. Nach SCHOBER, CHRIST und PRINZ (60) sprechen ihre Versuchsergebnisse eindeutig gegen die Funktion der Zellkern-Nukleinsäuren als wirksame Substanz.

Die verschiedenen Untersucher beurteilen die Schalmprobe hinsichtlich der Eignung als diagnostisches Hilfsmittel zum Nachweis der Mastitis sehr unterschiedlich. HEIDRICH und RENK (20) berichten über teilweise erhebliche Fehlresultate in allen Klassifizierungsbereichen bei Viertel-, Einzel- und besonders bei Kannenmilchproben. LEIDL und SCHALM (36) halten hingegen den Schalm-Mastitis-Test für eine gute Übersichtsmethode zur raschen und billigen Untersuchung von Sammelmilchen in Bezug auf ihre

Qualität beziehungsweise mindere Qualität, soweit diese durch einen hohen Zellgehalt bedingt ist. BAIER (1) hält den Schalm-Mastitis-Test im Rahmen der planmäßigen Euterkontrolle für ausreichend zuverlässig. OBIGER (49) stellt fest, daß der Schalmtest häufig eine zu hohe Reaktion aufweist. Besonders in der Sommerzeit fand er 60 - 80 % positive Schalmreaktionen, die ohne nachweislichen Zusammenhang mit Milchveränderungen beziehungsweise mit Zellerhöhungen standen.

SEELEMANN (64) lehnt den Schalmtest ab, weil bei schwach erhöhtem Zellgehalt und positiver Schalmprobe recht häufig die Katalaseprobe und der Chlorgehalt keine Abweichungen von der Norm zeigten. Andererseits stellen SEELEMANN und MEYER (66) fest, daß die Schalmprobe als Schnellmethode im Laboratorium in Frage kommt und als ein geeignetes Verfahren zur indirekten Zellzählung zu werten ist. LEIDL, SCHALM, KRIEGER und LAGEMANN (37) weisen nach, daß die Ergebnisse der Schalmreaktion einen brauchbaren Schlüssel zur Einstufung von Milchproben entsprechend ihrem Zellgehalt darstellen. DEDIÉ (8) vergleicht den Ausfall der Schalmprobe mit den Ergebnissen der Zellzählung im Sediment und stellt in positiven Bereichen eine Übereinstimmung in 90 - 100 % der Fälle fest. JENRICH (20) erhärtet diese Ergebnisse. KIELWEIN (31) vergleicht die Schalmprobe, die Whitesideprobe, die Katalaseprobe und die Chlorgehaltsprobe untereinander. Hierbei dient ihm nicht der Zellgehalt als Maßstab der Sekretionsstörung, sondern er nimmt eine entzündliche Sekretionsstörung dann als gegeben, wenn wenigstens vier der fünf durchgeführten Proben ein positives Ergebnis erbringen. Es zeigt sich, daß die Schalmprobe nur in 2 % falsche Ergebnisse erbringt, die Zellzahlbestimmung nach BREED jedoch 1,5 % falsche negative und 14,5 % falsche positive Werte.

BAIER und LEIDL (2) untersuchen 35 877 Viertelgemelksproben und finden mit zunehmendem Reaktionsgrad des Schalm-Mastitis-Testes ein immer häufigeres Auftreten von Staphylokokken und Streptokokken.

Als sehr treffsicher zur Feststellung von Mastitisbeständen und Beständen mit einzelnen Euterstörungen, erwies sich nach HARR (16) die Schalmprobe in der Kannenmilchuntersuchung. Dabei konnten 92,8 % der Mastitisbestände erfaßt werden.

2.1.2.3. Bakteriologische Untersuchung

OBIGER (49) bezeichnet die bakteriologische Untersuchung als das Kernstück der Diagnostik von Euterkrankheiten. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich die Tiefenkultur, wie sie nach STECK (71) in der Schweiz angewendet wird, und die Oberflächenkultur, die sich heute allgemein durchgesetzt hat. Aus Gründen der Vielseitigkeit und der günstigen Wachstumsbedingungen bevorzugt DIERNHOFER (10) die Traubenzuckervollblut-Agarplatte.

Zur Feststellung von Galt-Streptokokken erwies sich nach SEELEMANN und OBIGER (67) der CAMP-Test und das TKT-Medium (Thallium-Sulfat-Kristallviolett-Toxinblutagar) als besonders treffsicher, wirtschaftlich und in der Ausführung einfach. Durch den Hemmstoffzusatz sind Streptokokken der Serogruppe-B als taubenblaue, spiegelnde, glatte Kolonien mit einem mehr oder weniger ausgeprägten Beta- hämolytischen Hof leicht zu erkennen. Dennoch ist nach TILGNER, SCHIERHOLZ und JEDER (72) ein eindeutiges Erkennen des Untersuchungsmaterials noch nicht möglich.

Als ein sicheres kulturelles Hilfsmittel bezeichnen sie die CAMP-Platte. Der auf Beobachtungen von CHRISTIE, ATKINS, MUNCH und PETERSEN beruhende, nach den Anfangsbuchstaben der Autoren genannte CAMP-Test, wird definiert als eine schalenförmige, vollständige Hämolyse, die dort auftritt, wo Stoffwechselprodukte der Serogruppe-B-Streptokokken mit dem Beta-Toxin von Staphylokokken in einer gewöhnlichen Blutplatte zusammentreffen. Durch Zusatz von 0,1 % Aeskulin kann gleichzeitig das Aesculin-spaltungsvermögen der Streptokokken untersucht werden. (zit. nach SCHÖNHERR (59)).

MEYN und GEDEK (42) stellen fest, daß zur Differenzierung von *Streptococcus agalactiae* in CAMP-Test Rinderblut dem Hammelblut vorzuziehen ist. BECHT (3) setzt seinem Nährboden, auf dem jeder Mastitisserreger gezüchtet werden kann und der gleichzeitig die Erkennung einer *Streptococcus agalactiae*-Kolonie erlaubt, Beta-Toxin, Kälberblut und Kongorot zu. Dieser Farbstoff unterdrückt die Beta-Hämolyse, ohne das CAMP-Phänomen zu hemmen. Bei der Diagnose von Staphylokokkenmastitis begnügt sich OBIGER (49) mit der einfachen Blutplatte. Sie erlaubt eine Feststellung des Hämolysevermögens (Alpha-, Beta-, Delta- und Etatoxin), der Pigmentbildung und ergibt Aufschluß über die Morphologie der Plattenkolonien.

Auf Grund der biochemischen Methoden zur Bestimmung des Mannitspaltungsvermögens, Bildung von Gelatinase, Hyaluronidase, Phosphatase und Koagulase sieht OBIGER (46) keine Möglichkeit eine Aufteilung in pathogene und harmlose Staphylokokken vorzunehmen. Er beurteilt in der Milch vorkommende Staphylokokken nach dem Grad der jeweiligen Sekretionsstörung. So findet WORSECK (75) unter 45 euterpathogenen Staphylokokkenstämmen nur 14 die in den 5 Kriterien, Pigmentbildung, Hämolyse, Gelatinolyse, Plasmakoagulase und Mannitfermentation positiv ausfielen.

2. 2. Anfangs- und Endgemelk in der unterschiedlichen Bewertung zur Diagnose von Euterkrankheiten

2.2.1. Zellgehalt

Wie HAUKE (17) darstellt, wurde die Zellzahlgrenze für normale Milch von den verschiedenen Autoren in den letzten 50 Jahren mit bemerkenswerten Schwankungen angegeben. Dies ist wahrscheinlich nicht nur auf die verschiedenen Zellzählverfahren, sondern wie OBIGER (45) betont, auch darauf zurückzuführen, daß häufig nicht ersichtlich ist, aus welchen Fraktionen des Gemelks die angegebenen Werte stammen.

Schon STECK (70) konnte feststellen, daß innerhalb der verschiedenen Gemelksfraktionen ein unterschiedlicher Keim- und Zellgehalt auftritt. DIERNHOFER (10) bestätigt dies und weist wie KÄSTLI und BINZ (27) auf einen erhöhten Zellgehalt im Endgemelk hin. In pathologisch veränderten Milchsekreten soll der Zellgehalt im Endgemelk nach RUSSEL und HOFFMANN (54) das dreifache der Zellzahl des Anfangsgemelks aufweisen können. Auch KESSLER, REID und KNODT (29) stellen einen ansteigenden Leukozytengehalt in Richtung auf das Endgemelk fest. Auf eine gewisse Fehlbeurteilung in der zytologisch-diagnostischen Untersuchung machen SEELEMANN und MEYER (66) aufmerksam. Die Verfasser stellen fest, daß bei völlig eutergesunden Tieren der Zellgehalt im Anfangsgemelk und Endgemelk keine Unterschiede aufzuweisen brauche. Häufig sei aber der Zellgehalt im Endgemelk etwas erhöht. Leichte Reizzustände seien eben nur

im Endgemelk zu ermitteln SEELEMANN (62) macht bei der Untersuchung kranker und gesunder (Prozentwerte in Klammer) Euterviertel die Feststellung, daß 32,6 % (42,4 %) im Anfangsgemelk und Endgemelk gleiche Zellzahlen aufwiesen. Eine höhere Zellzahl trat bei 52,8 % (47,7 %) im Endgemelk und bei 14,6 % (9,9 %) im Anfangsgemelk auf

2.2.2. Euterpathogene Mikroorganismen

Verschiedentlich weisen die Autoren auf einen erhöhten Keimgehalt im Anfangsgemelk hin. So hält es DIERNHOFER (10) für angebrachter, bei Bestandsuntersuchungen, die vorwiegend latente Fälle zur Aufdeckung bringen sollen, das Anfangsgemelk zu verwenden. Diese Probe sei bei keimarmen Vierteln für die bakteriologische Untersuchung ergiebiger. Ebenso halten KESSLER, REID und KNODT (29) eine Entnahme der Proben aus dem ersten Strahl bei Mastitiden, die mit *Streptococcus agalactiae* infiziert sind, für günstig, da diese mit großer Wahrscheinlichkeit im ersten Strahl zu finden sind. Bei der kulturellen Untersuchung von Streptokokken infizierter Euterviertel ergab sich in 67,7 % eine Erfassung sowohl im Anfangsgemelk als auch im Endgemelk, 2,6 % konnten nur im Endgemelk und 29,7 % nur im Anfangsgemelk erfaßt werden (SEELEMANN (62)). ERNST (12) wie auch KLIMMER und HAUPT (34) ziehen es vor, aus dem mittleren Gemelk der einzelnen Viertel, Proben zur bakteriologischen Untersuchung zu verwenden.

Bei Staphylokokkeninfektionen beobachtet RENK (52) ebenfalls eine höhere Keimzahl im Anfangsgemelk. IBRAHIM, ABO-ELNAGA und KANDLER (21) bestätigen dies, begründen es aber damit, daß die Keime, von außen kommend, den Strichkanal besonders intensiv besiedeln. Beim Vergleich der Keimzahlen aus Anfangsgemelk und Endgemelk macht GRABER (15) bei infizierten Euterkatarrhen die Feststellung, daß die Keimzahl im Gesamtgemelk, trotz zusätzlicher Melkkontamination, wesentlich niedriger liegt, als die im Anfangsgemelk festgestellten Werte.

SCHREINER (61) ist der Ansicht, daß die Verwertung unterschiedlicher Gemelksfraktionen für die diagnostische Untersuchung zu verschiedenen Befunden führen kann. Um diese Faktoren zu berücksichtigen, erachtet

es KRÜGER (35) für notwendig, die Uhrzeit der Probeentnahme in das Protokollformular einzutragen, um bei der Beurteilung Hinweise auf Anfangs- und Endgemelk zu bekommen.

2.2.3. Schalmprobe

SCHALM und NORLANDER (56) weisen darauf hin, daß die Reaktion innerhalb eines Gemelks nicht-gleichmäßig ausfallen müsse. Besonders bei Milchdrüsen mit einem begrenzten Reizzustand könne sich im Endgemelk eines Viertels innerhalb der gleichen Melkzeit die Reaktionsstärke ändern. So macht auch SEELEMANN (64) auf eine Reaktionsänderung im Endgemelk aufmerksam und stellt wie SCHALM fest, daß leichte Reizzustände erst im Endgemelk durch den Schalmtest angezeigt werden (SEELEMANN und MEYER (66)).

2.2.4. Gemelke in der Zwischenmelkzeit

GADIENT (14) weist nach, daß der Keim- sowie der Zellgehalt infizierter Euterviertel in der Zwischenmelkzeit großen Schwankungen unterliegen. Im wesentlichen zeigt sich jedoch im Ablauf der Zwischenmelkzeit einerseits ein Ansteigen der Keimzahl und andererseits ein Absinken der Zellzahl. Für die Probenentnahme zu bakteriologisch-diagnostischen Zwecken schlägt GADIENT die Anfangsgemelke des Nachmittags vor, mit der Begründung, sie enthalten ein Maximum an Keimen und ein Minimum an Zellen.

2.3. Milchprobenentnahme

Bei der Diskussion um die Einstufung der bakteriologischen Untersuchung in ihrer Bedeutung für die Diagnose einer Eutererkrankung ist die Frage zu stellen, wie man Proben erhält, die allein den Keimgehalt der Milchdrüse reproduzieren. Bekanntlich ist die Milch ein gutes Nährmedium für alle Keimarten. Unerwünschte Keime, die bei der Probeentnahme aus dem Stallmilieu in die Probe gelangen, können sich unter Umständen

schnell vermehren und die bakteriologische Diagnose stören.

Nach DIERNHOFER (10) hängt das Gelingen der bakteriologischen Untersuchung in erster Linie vom Probenehmer ab. DIERNHOFER gibt folgende Methode der aseptischen Probeentnahme an: Nach Abmelken des ersten Strahles in eine Vormelkschale wird die Zitzenspitze sorgfältig mit Alkohol oder Ätheralkohol gereinigt und desinfiziert. Bei totaler Verschmutzung des Euters mit Kot schlägt er eine "Gesamtreinigung" vor. Diese soll aber einige Zeit vor der eigentlichen Probenentnahme geschehen, damit bei der Säuberung aufgewirbelte Schmutzpartikel bis zur eigentlichen Probenentnahme zu Boden gesunken sind. Die Entnahme der Probe selbst wird nach einer genau vorgeschriebenen Technik vorgenommen. Nach dieser Methode sollen Milchproben selbst in warmen Jahreszeiten bei langer Transportzeit in brauchbarem Zustand im Labor angekommen sein. OBIGER (49) hält bei einem äußerlich sauberen Euter das Abwaschen und Desinfizieren der gesamten Zitze für genügend. Nur in bestimmten Fällen erachtet er eine anschließende Reinigung der Zitzenspitze mit alkoholgetränktem Wattebausch für notwendig. Vor der Probeentnahme sollen die ersten Strahlen abgemolken und verworfen werden. Auch SEELEMANN und OBIGER (68) schlagen vor, die Zitze mit einem geeigneten Desinfektionsmittel abzureiben, um das Hineinfallen von "fakultativ pathogenen" Keimen in das Probeglas zu verhindern. SCHALM und LASMANIS (57) nehmen hierzu eine hochprozentige Natriumhypochloridlösung.

OBIGER (46) berichtet, daß in Proben, die vom Melkpersonal unter unsauberen Bedingungen genommen wurden, gehäuft Galt-Streptokokken und hämotoxinbildende Staphylokokken festgestellt wurden. Entnahm man nach 8 Tagen in diesen Beständen sterile Proben mit der Spritze, so konnte in den wenigsten Fällen der Befund der ersten Untersuchung bestätigt werden. FRANK (13) und SEELEMANN (64) weisen darauf hin, daß euterpathogene Mikroorganismen zwar ihren Hauptfundort in der Milchdrüse haben, häufig aber auf der Euterhaut und der Zitze gefunden werden. Bei der Probeentnahme können sie daher leicht in die Milch gelangen und eine Besiedlung der Milchdrüse vortäuschen. Staphylokokken-Stämme, die nach ihren biologischen Merkmalen als potentiell pathogen angesehen werden müssen, wurden von OBIGER (50) an der Euterhaut, an der Zitze und an der Schenkelinnenfläche gefunden. FRANK (13) und SEELEMANN (64) halten jedoch die Herkunft der Mikroorganismen aus der Milchdrüse mit größter Wahr-

scheinlichkeit für gesichert, wenn das Probegemelk nach sorgfältiger Euter-, Zitzen- und Händedesinfektion in ein steriles Gefäß entnommen wird.

Aber selbst Proben, bei denen eine sekundäre Infektion ausgeschlossen werden kann, werden von verschiedenen Autoren bei der bakteriologischen Auswertung kritisch beurteilt. STECK (70) spricht von einer "normalen Euterflora" in der Zisternenmilch, wozu er das *Corynebacterium lipolyticum*, *Pseudomonas pyocyaneum*, Streptokokken, Colibakterien und Staphylokokken zählt. LITTLE, WAYNE und PLASTRIDGE (39) wenden sich gegen den Begriff einer "normalen Euterflora" indem sie feststellen, daß nichthaemolytische und koagulase negative Staphylokokken, die sowohl im Euter als auch im Stallmilieu zu finden sind, häufig einen leichten Reizzustand des Euters hervorrufen, der sich in einer Erhöhung des Leukozytengehaltes äußert. So weisen HAWKER, LINTON, FOLKES, CARLILE (18), OBIGER (49) auf die mannigfaltigen Möglichkeiten für Keime aller Arten hin, über den Strichkanal in die Zitzenzisterne und weiter einzudringen. Nach DIERN-HOFER (10) ist das häufig vorkommende *Corynebacterium bovis* (*lipolyticum*) lediglich ein Bewohner des verhornten Zitzenkanalepithels. Als gutes "Infektionstor" bezeichnet BRODAUF (4) einen Strichkanal, der einen leichten Milchabfluß gestattet. Auch RENK (zit. nach SEELEMANN und OBIGER (68)) hält den Strichkanal nicht für keimfrei, sondern spricht von einer Besiedlung mit *Corynebacterium bovis*, Streptokokken und Staphylokokken. Eine Desinfektion der Zitzenoberfläche könne diese Keime nicht erreichen. Auch KIELWEIN (30) fand Galt-Streptokokken im Strichkanal eutergesunder Kühe. Diese Keime ließen sich aber durch Wegmelken des ersten Strahls beseitigen. Über das Vorkommen von coliformen Keimen in mindestens einem Strich bei 38 % der untersuchten Tiere berichtet DITTMAR (11).

HEIDRICH, MÜLLING und BIRKNER (16) führten bei durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchprobe vergleichende bakteriologische Untersuchungen durch. Hierbei wurden in den 108 Vierteln von 27 klinisch eutergesunden Rindern bei der Zisternenpunktion nur in 7 Vierteln euterpathogene Mikroorganismen ermittelt. Die durch Handmelken unter saubersten Bedingungen gewonnenen Vergleichsproben ergaben alle einen Keimgehalt. Die Verfasser kommen zu der Schlußfolgerung, daß durch Handmelken, selbst nach peinlichsten hygienischen Vorbereitungen, nie sterile Milchproben entnommen werden können. Die meisten der nicht aus der Milchdrüse stammenden Keime würden beim Passieren

der Zitrenzisterne und des Strichkanals in die Proben gelangen.

2. 4. Einfluß der Temperatur auf die Beschaffenheit der Milchprobe

2.4.1. Einfluß auf das Keimwachstum

Das Wachstum von Einzelzellen wie von Populationen wird durch die genetische Beschaffenheit der Spezies oder des Stammes und eine Reihe innerer und äußerer Faktoren geregelt.

Die äußeren wachstumsbeeinflussenden Faktoren sind:

- a) Temperatur
- b) Nährstoffangebot
- c) Atmosphärische Einflüsse
- d) Konkurrenz

Die Zellteilung beginnt nicht sofort nach der Übertragung einer Einsaat in ein frisches Medium. Nach einer anfänglichen Ruheperiode beginnt die Stoffwechseltätigkeit und schreitet mit zunehmender Geschwindigkeit fort. Die sich ergebende Zunahme an Zellmaterial führt zu einer Größenzunahme der Zellen. Wachstum und Zellteilung beginnen in der Beschleunigungsphase und erreichen beim Übergang in die Exponentialphase ihren Höhepunkt. (zit. nach HAWKER, LINTON, FOLKES, CARLILE (18)).

GRABER (15) beobachtete beim Wachstum euterpathogener Mikroorganismen in frisch gewonnener Milch keine anfängliche Ruheperiode. Dagegen stellte er fest, daß bei einer Keimflora, die auf Kot- und Luftinfektion zurückzuführen war, erst nach 4 - 5 Stunden ein erhebliches Wachstum bei 38° C und ein geringes bei 25° C begann. Keine Erhöhung der Keimzahl konnte er bei 10° C feststellen. MEEDER (41) prüfte das Wachstum an milchadaptierten *Streptococcus - lactis* - Stämmen bei 30° C innerhalb 5 Stunden. Er konnte dabei in den ersten zwei Stunden eine geringe anfängliche Wachstumshemmung feststellen. RÜTTIMANN (53) bestätigte dies und machte dieselbe Feststellung auch für *Aerobakter aerogenes* und *Echerichia coli*.

IBRAHIM, ABO-ELNAGA und KANDLER (21) verfolgten das Wachstum von Milchsäurestreptokokken und coliformen Keimen in Milch. Dabei stellten sie bei 10° C sowie 15° C nach einem Tag eine deutliche Keimvermehrung fest, die zwischen dem 3. und 5. Tag in einer Stagnation auslief. Außerdem zeigte sich, daß die ~~dominierende~~ Flora dieser Keime das Wachstum Koagulase positiver Staphylokokken wesentlich unterdrücken konnte. Zeigten Milchsäurestreptokokken bei 4° C bis zum 5. Tag kein wesentliches Wachstum, so trat bei 2,5° C nach 4 Tagen eine beschleunigte Wachstumsphase der coliformen Keime ein.

Wurde vom obigen Autor die Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit diskutiert, so stellte KANDLER (28) fest, daß die Optima für die Wachstumsgeschwindigkeit und die des Gesamtmassenzuwachses (Zellzahl) verschieden liegen können.

So zeigte er, daß besonders bei Pseudomonasarten die Optima für die Wachstumsgeschwindigkeit und die des Gesamtmassenzuwachses sehr verschieden liegen können. Während ersteres zum Beispiel bei 30° C liegt, kann letzteres bei 5° C liegen.

2.4.2. Einfluß auf die Schalmprobe

SCHALM und NOORLANDER (56) machen darauf aufmerksam, daß in Kannen- und Sammelmilch bakterielles Wachstum den Faktor oder die Faktoren zerstört, die eine positive Reaktion im Kalifornia-Mastitis-Test bedingen. Sie empfehlen daher nur in kühlen Jahreszeiten die Untersuchung durchzuführen. OBIGER (49) beobachtete bei schalmnegativen Proben innerhalb 64 Stunden bei Zimmertemperatur einen Anstieg der Reaktionsbereitschaft. Dies führte er auf die Art, die verschiedene Reaktionsfreudigkeit und die Aktivität der Bakterien zurück. Stark schalmpositive Proben, die bei Zimmertemperatur gelagert wurden, zeigten innerhalb 88 Stunden ein deutliches Sinken der Reaktion. Hingegen änderte sich die Schalmreaktion bei Lagerung im Kühlschrank (0° C) nur unwesentlich. OBIGER (47) weist auf die Bedeutung für die Laboratoriumsuntersuchungen hin, die sich aus derartigen Änderungen der Reaktionsfreudigkeit während der Lagerung ergibt. Im Gegensatz zu SCHOBER, CHRIST und PRINZ (60) konnte OBIGER (47) keine Reaktionsänderung bei Verschiebung des pH-Wertes zwischen 5,0 und 9,0 feststellen.

2. 5. Konservierungsmittel als Zusatz bei Milchproben

DIERNHOFER (10) lehnt den Zusatz von Konservierungsmitteln grundsätzlich ab. Nach seiner Meinung ist die wachstumshemmende Wirkung der empfohlenen Konservierungsmittel (Borsäure, Bichromat und dergl.) auf Schmutzkeime stets weniger stark als auf pathogene Mikroorganismen. Dadurch können etwa vorhandene pathogene Keime abgetötet und kulturell nicht erfaßt werden. SEELEMANN (63) empfiehlt, den sterilen Proberöhrchen 1% Borsäure zur Konservierung auf dem Transportweg beizufügen und ist der Meinung, daß dies ohne Einfluß auf das Wachstum der Kulturen ist. Ebenfalls von SEELEMANN (62) sind vorgeschlagen, zu einer Milchprobe von 50 ml 1 Tropfen Formalin zuzugeben. Neben Borsäure (1:200) erwähnt SCHÖNHERR (58) eine Reihe von Konservierungsstoffen für Milchproben, die keine Schädigung der Keimflora verursachen sollen: Cialit 1:10 000, Merthiolat 1:25 000, Formalin 1:1 000.

Über die Beeinflussung des Schalmtestes durch chemische Substanzen, wie sie Konservierungsmittel darstellen, ist in der Literatur wenig erwähnt. Lediglich DEDIÉ und KIELWEIN (9) machen auf die Formalinempfindlichkeit des schalmwirksamen Prinzips aufmerksam. MATSCHULLAT (40) erwähnt, daß die BRABANTER-Mastitis-Reaktion, eine ebenfalls auf oberflächenaktiven Stoffen basierende Methode, durch den Zusatz von Konservierungsmitteln (Borsäure) nicht beeinflusst wird.

3. PROBLEMSTELLUNG

Im Rahmen des Eutergesundheitsdienstes muß bei der Probeentnahme **rationell** gearbeitet werden, um durch ein Minimum an Aufwand den bestmöglichen Effekt zu erreichen; die Sicherheit der Diagnose muß jedoch oberstes **Gebot** sein. Aber nicht nur die Milchprobenentnahme kann sich nachteilig auswirken, sondern auch während der Lagerung und dem Transport ist die Milchprobe den verschiedensten Einflüssen unterworfen. Für die Routinearbeit im Eutergesundheitsdienst ist daher die Kenntnis der Beeinflussung von Milchproben durch Entnahme und Transport von großer Bedeutung.

In vorliegender Arbeit soll zu klären versucht werden, welche Bedeutung der Technik sowie dem Zeitpunkt der Milchprobenentnahme und der weiteren Behandlung der Milchproben zukommt. Die Untersuchungen sollen zur Empfehlung praxisgeeigneter Methoden mit objektivem Aussagewert beitragen.

Der Literatur kann wohl entnommen werden, daß Unterschiede zwischen den Gemelksfraktionen bestehen, die Beurteilung ist aber nicht einheitlich.

Wenn auch die Mehrzahl der Untersucher darüber übereinstimmt, daß eine Desinfektion des Euters bei der Probeentnahme der Erreichung guter Proben förderlich ist, so liegen in der Literatur doch keine eindeutigen Beweise dafür vor. Insbesondere ist der Grad der nachteiligen Beeinflussung einer Probeentnahme ohne Desinfektionsmaßnahmen bei keinem der Autoren eindeutig definiert; dies wird im Rahmen dieser Arbeit versucht.

Im Rahmen von Vorversuchen sollten die Faktoren ermittelt werden, die bei den späteren Hauptuntersuchungen entweder vernachlässigt werden können, oder entsprechend berücksichtigt werden müssen. Hierbei wurde geprüft, inwieweit der Keimgehalt der Stallluft den Aussagewert des bakteriologischen Befundes beeinflussen kann, welche Einwirkung kontinuierliches Schütteln auf die spätere Schalmreaktion hat, und ob das Keimwachstum von der Milchmenge abhängig ist. Außerdem wurde geprüft,

mit welcher Treffsicherheit Keimzahlen zwischen 100 und 500 pro ml Milch durch den Ausstrich mit einer Platinöse (Fassungsvermögen 0,01 ml) erfaßt werden.

Ziel der Hauptuntersuchung ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche Unterschiede bestehen innerhalb der Gemelksfraktionen für die diagnostische Untersuchung?
2. Welchen Einfluß hat der Zeitpunkt der Probenentnahme in der Zwischenmelkheit?
3. Welche Bedeutung hat die Reinigung und Desinfektion des Euters vor der Probenentnahme für die Eignung der entnommenen Milchprobe für Laboratoriumsuntersuchungen?
4. Welchen Einfluß haben Temperatur und Zeit auf die Milchprobe während der Lagerung und des Transportes?
5. Welchen Einfluß hat der Zusatz von Konservierungsmitteln in Milchproben auf die diagnostische Untersuchung?

4. EIGENE VERSUCHE

4. 1. Untersuchungsmaterial und Methodik

4.1.1. Herkunft der Proben und Probenentnahme

Die Auswahl der Bestände erfolgte unter Berücksichtigung der Aufzeichnungen des Eutergesundheitsdienstes über Stallhygiene und Eutergesundheit. Insgesamt wurden 124 Proben für Vorversuche und 2369 Proben für die Hauptversuche entnommen und ausgewertet.

Zur Desinfektion der Zitzenkuppen wurde dem Präparat *Septikal* (Firma Schülke und Mayr GmbH Hamburg 39) der Vorzug gegeben. Euterwaschungen wurden mit einer 5%igen Lösung von *Sokrena 113* (Bacillofabrik Dr. Bode & Co.) durchgeführt.

Milchprobenentnahme

Zur Probenentnahme wurden sterile Glasflaschen mit einem inneren Öffnungsdurchmesser von 2 cm, einer Höhe von 11 cm und einem Fassungsvermögen von ca. 44 ml verwendet. Die Flaschen werden mit einem sterilen Gummistöpsel verschlossen. Nur in Ausnahmefällen, wenn man eine größere Milchmenge benötigte kamen entsprechende Glaskolben zur Verwendung.

Bei der Probenentnahme ohne Desinfektion wurden die Proben nach der im Eutergesundheitsdienst angewandten Methode entnommen. Die Viertel werden hierbei wie folgt bezeichnet:

Viertel vorne links = 1, Viertel hinten links = 2, Viertel hinten rechts = 3, Viertel vorne rechts = 4.

Die Proben werden in der Reihenfolge 1,2,3,4 entnommen. Nach Abmelken des 1. Strahls in eine schwarze Vormelkschale zur Prüfung auf grobsinnlich wahrnehmbare Sekretveränderungen und zur Durchführung der

Schalmreaktion nimmt man 4 Probegläser in die linke Hand auf. Hierbei liegt Glas Nr. 1 zwischen Ringfinger und Mittelfinger, Nr. 2 zwischen Mittel- und Zeigefinger, Glas Nr. 4 wird nach Glas Nr. 3 zwischen Daumen und Zeigefinger derselben Hand aufgenommen. Die mit Probegläsern bestückte Hand wird so gehalten, daß die Glasöffnungen senkrecht nach unten gerichtet sind, wobei die Handfläche nach oben weist. Mit der rechten Hand wird nun der Gummistöpsel von Glas Nr. 1 erfaßt, gelockert und mit dem äußeren Rand zwischen kleinen Finger und Ringfinger der linken Hand geklemmt, ohne daß hierzu die Innenfläche des Stöpsels mit der Hand in Berührung kommt. Der Probennehmer erfaßt nun die Zitze von Viertel 1 (vorne links). Beim Abmelken der Proben in die Probegläser werden diese in nahezu waagrechte Lage gebracht, wobei der freie Gummistöpsel durch die darüber liegende Hand gegen sinkende Staubpartikel geschützt wird. Bei einem Abstand von 1 - 2 cm zwischen Zitzenkuppe und Glasöffnung spritzt man den Milchstrahl möglichst waagrecht in das Glas. Anschließend lockert man den Stöpsel von Glas Nr. 2 und setzt ihn unter drehender Bewegung auf Glas Nr. 1. Ist das Glas Nr. 4 mit der Milchprobe gefüllt, so wird der freie Stöpsel wieder mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand vorsichtig am äußeren Rand ergriffen und auf die Öffnung des letzten Probeglasses gesetzt.

Bei den Versuchen mit Probenentnahme unter Anwendung von Desinfektion werden die Zitzenkuppen nach der Anregung von DIERNHOFER (10) in der Reihenfolge 2-1-3-4 gesäubert und desinfiziert. Dabei findet ausschließlich das Desinfektionsmittel *S e p t i k a l* Verwendung. Die Entnahme der Milchprobe vollzieht sich dann in umgekehrter Reihenfolge. Jede einzelne Zitzenkuppe wird mit ein oder zwei sauberen Zellstofftupfern unter drehender Bewegung gesäubert und desinfiziert. Nach einer Einwirkungszeit von 3 Minuten reinigt man der Strichkanal von Schmutz und Desinfektionsmittelresten durch Abmelken eines Milchstrahls und entnimmt anschließend die Probe nach oben beschriebener Methode.

4.1.2. Bakteriologische Untersuchung

Zur bakteriologischen Untersuchung wird ein 10%iger ACD-Rinderblutagar-nährbogen mit 0,1% Dextrosezusatz verwendet. Zur Untersuchung gelangt gut durchgeschüttelte, nicht zentrifugierte Milch, wobei zwei Verfahren

angewendet werden:

- a) Ausstreichen von 0,01 ml Milch mit der Platinöse auf einem Blutplatteviertel
- b) Ausspatelung von 0,1 ml Milch unter Verwendung eines Glasspatels auf einer ganzen Blutplatte.

Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C werden die Platten abgelesen. Die gewachsenen Kolonien werden nach ihrer Morphologie und Hämolysebildung beurteilt. In Zweifelsfällen wird eine bakterioskopische Untersuchung durchgeführt. Eine weitere Differenzierung wird nur bei den Streptokokken eingeleitet, d. h. diese Keime werden auf die Bildung des CAMP-Phänomens sowie auf Aesculinspaltung geprüft.

Eine noch weitergehende bakteriologische und serologische Differenzierung der gefundenen Erreger ist für die Beurteilung eines Mastitisbestandes hinsichtlich der Prognose und Therapie in der Regel entbehrlich.

Die STREPTOKOKKEN wurden in folgende Erregergruppen unterteilt:

1. CAMP-positive Streptokokken, Aesculin negativ mit und ohne Beta-Hämolyse; *Streptococcus agalactiae*.
2. CAMP-negative Streptokokken mit Beta-Hämolyse; Beta-hämolytische Streptokokken.
3. CAMP-positive und CAMP-negative Streptokokken, Aesculin positiv: Überwiegend *Streptococcus uberis*.
4. CAMP-negative Streptokokken, Aesculin negativ: Sonstige Streptokokken.

STAPHYLOKOKKEN werden auf der Blutplatte nach folgenden Gesichtspunkten eingeteilt:

1. Hämotoxinbildende Staphylokokken:
 - a) Beta-toxinbildende Staphylokokken
 - b) Alpha-toxinbildende Staphylokokken
 - c) Delta-toxinbildende Staphylokokken

2. Mikrokokken mit oder ohne Pigmentbildung.

Eine Abtrennung von Staphylokokken durch die Koagulaseprobe unterblieb, da erfahrungsgemäß die Koagulase-positiven Staphylokokken in den meisten Fällen Hämotoxinbildner sind.

4.1.3. Zellzahlbestimmung nach PRESCOTT und BREED

Aus gut durchmischter Milch wird mit geeichter Pipette 0,005 ml entnommen und auf einen entfetteten Objektträger mit rechtwinklig abgebogener Nadel aufgetragen. Durch eine unterlegte Schablone wird das ausgestrichene Quadrat (1 cm²) markiert.

Bei der Färbung wird die Methode nach BROADHURST angewandt.

Farblösung

Äthylalkohol p. a.	370 ml
Methylenblau (in Substanz)	3 g
Fuchsinlösung (gesättigt)	20 ml
Anilin	10 ml
Schwefelsäure 10%	25 ml
aqua destillata	430 ml

Das luftgetrocknete Präparat wird 5 Minuten in Xylol fixiert, 5 Minuten in Äthanol entfettet und anschließend 30 Sekunden in der Farblösung nach BROADHURST gefärbt.

Unter dem Mikroskop (Objektiv 1:100 mit Ölimmersion, Okular 1:8) werden 10 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation dieser Durchschnittszahl mit dem mikroskopischen Faktor wird der Zellgehalt in 1 ml Milch berechnet. Da die angewandte Färbung eine Differenzierung in Leukozyten und Epithelzellen erlaubt, wurden die Zelltypen getrennt ausgezählt.

4.1.4. Zellgehaltsbestimmung im Sediment

Zur Zeck der Zellgehaltsschätzung im Sediment werden jeweils etwa 10 ccm Viertelgemelk 15 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Abgießen der Milch wird eine Öse Sediment (0,01 ml) mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf einem Objektträger vermengt und ausgestrichen. Das Präparat wird hitzefixiert und anschließend drei Minuten lang mit Löffler's Methyleneblau gefärbt. Bei 800-facher Vergrößerung (Objektiv 100 und Okular 8 x) werden pro Präparat 10 Blickfelder auf vorhandene Zellen hin ausgezählt und schließlich der Mittelwert bestimmt.

4.1.5. Schalmprobe

Zur Durchführung der Schalmprobe werden nach DEDIÉ und KIELWEIN (9) in einem Agglutinationsröhrchen 1 ccm Milch und 1 ccm Testflüssigkeit gemischt. Die Restflüssigkeit enthält auf 1000 ml Aqua destillata 40 g Na-Dodecylsulfat und 240 g Harnstoff. Diese Lösung wird mit $\frac{1}{1}$ NaOH (etwa 5 ml) pH 8,0 eingestellt. Bei Ablesung der Reaktion wird das Agglutinationsröhrchen nahezu waagerecht gehalten und zwischen Daumen und Zeigefinger gedreht. Die Beurteilung des Testes im Röhrchen erfolgt nach - folgendem Schlüssel:

Reaktion	Zustand des Testgemisches
0	Test-Milchgemisch bleibt milchartig, keine Schlierenbildung beim Abfließen über die Glaswand.
+	Test-Milchgemisch bleibt dünnflüssig, schwache Faden- und Schlierenbildung beim Abfließen über die Glaswand.
++	Test-Milchgemisch ist leicht schleimig, bildet beim Abfließen deutliche Schlieren, hat aber noch Flüssigkeitscharakter.

Reaktion	Zustand des Testgemisches
++	Test-Milchgemisch ist dickschleimig, aber nicht homogen.
+++	Test-Milchgemisch ist homogen gelatinöschleimig, hängt aber beim Abfließen noch nicht zusammen.
++++	Test-Milchgemisch bildet einen homogenen, zusammenhängenden, dickschlammigen Klumpen.

4.1.6. Untersuchung der Gemelksfraktionen

Die Untersuchungen wurden in drei großen Milcherzeugerbetrieben mit je ca. 30-40 Tieren vorgenommen. Die Proben aus den Gemelksfraktionen des Anfangsgemelks wurden unmittelbar vor der Melkzeit entnommen. Dabei wurde der 1., 2., 4. und 8. Strahl getrennt in eine Probeflasche gemolken. Die Entnahme des Endgemelks erfolgte nach dem Melken.

a) Prüfung des Zellgehaltes.

Hierbei kamen die Gemelksfraktionen aus 100 Vierteln zur Auswertung, in denen im Anfangsgemelk der Befall von euterpathogenen Keimen bei der bakteriologischen Untersuchung festgestellt wurde und in deren 1. Strahl (Zellzählmethode nach PRESCOTT und BREED) Leukozyten nachgewiesen wurde. Bei der Auswertung wurde zwischen Gesamtzellzahl, Epithelzell- und Leukozytenzahl unterschieden.

b) Prüfung der Schalmreaktion

Die 5 Gemelksfraktionen aus 345 Eutervierteln wurden mit der Schalmprobe im Reagenzglas geprüft. Hierbei gelangten die Fraktionen von 210 infizierten und 135 nicht infizierten Eutervierteln zur Untersuchung.

c) Prüfung der Keimzahl

Bei den Untersuchungen über die Keimzahl der einzelnen Gemelksfraktionen kamen 148 Vierteln zur Auswertung. Dabei wurden bei der Auswahl

des Untersuchungsmaterials folgende Voraussetzungen verlangt:

1. Im Anfangsgemelk mußte eine Schalmreaktion von + und darüber nachgewiesen werden.
2. Beim Ausstrichverfahren mit der Platinöse auf Blutagarnährböden durften die Kolonien nicht im Keimrasen wachsen, um eine genaue Auszählung zu ermöglichen.
3. Die Keimart mußte in allen geprüften Fraktionen des Anfangsgemelks nachweisbar sein.

Bei der Auszählung der Keimkolonien fand eine Zähluhr Verwendung. Bei hohen Keimzahlen wurde durch ein in den Nährboden eingeschnittenes Raster die Auszählung erleichtert. Fanden sich bei den Ausstrichen eines Gemelkes durchschnittlich weniger als 10 Kolonien, so kam die Ausspätung von 0,1 ml Milch zur Auswertung.

d) Untersuchungen in der Melk- und Zwischenmelkzeit

Aus 28 Eutervierteln wurden im Verlauf eines Tages folgende Viertelgemelksproben entnommen:

6 Uhr (Morgenmelkzeit)	a) 2. Strahl des Anfangsgemelkes b) Endgemelk
9 Uhr, 12 Uhr und 15 Uhr	(Zwischenmelkzeit) 2. Strahl
18 Uhr (Abendmelkzeit)	a) 2. Strahl des Anfangsgemelkes b) Endgemelk

Spätestens 1 Stunde nach der Entnahme wurden diese Proben durch das Ausstrichverfahren bakteriologisch beurteilt und ihre Keimzahl bestimmt, durch die Zellzahlschätzung im Sediment auf ihren Zellgehalt und durch die Schalmprobe auf ihre Schalmreaktion untersucht.

4.1.7. Probenentnahme mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze

Insgesamt kamen 180 Tiere aus 20 Beständen zur Untersuchung. Dabei wurden 720 Viertelgemelksproben mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze gewonnen. Die Probenentnahme erfolgt morgens zwischen 8.00 und 13.00 Uhr unter Mithilfe eines Technikers des Eutergesundheitsdienstes, der den 1. Strahl in die schwarze Vormelkschale abmolk und dann unter An-

wendung der in 4.1.1. beschriebenen Technik, ohne vorherige Desinfektion, die erste Milchprobe entnahm. Untermittelbar danach wurde vom Verfasser eine Reinigung und Desinfektion der Zitzenspitze vorgenommen und eine zweite Milchprobe gewonnen. Das Untersuchungsmaterial gelangte baldmöglichst in das Labor, wurde dort bei Zimmertemperatur ($20 - 22^{\circ}\text{C}$) gelagert und innerhalb 24 Stunden 3 mal im Ausstrichverfahren bakteriologisch untersucht.

4.1.8. Untersuchungen über den Einfluß der Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und des Zusatzes von Konservierungsmitteln auf die bakteriologische Diagnose und die Schalmprobe.

Einfluß auf die bakteriologische Diagnose:

Unter Verwendung der Protokolle des Eutergesundheitsdienstes wurden Kühe nach Art der Infektion ausgesucht und für die entsprechenden Versuche vorgesehen. Aus 148 Anfangsgemelken wurden jeweils 100 ml Milch in einen sterilen Glaskolben gemolken. Stark verschmutzte Euterviertel wurden zuvor mit Sokrena 113-Lösung (0,5 %) im Zitzenbereich abgewaschen. Spätestens eine Stunde nach der Probenentnahme gelangte die Milch in das Labor, wo sie in einer Menge von 10 ml nach sechs verschiedenen Verfahren 5 Tage gelagert und alle 24 Stunden bakteriologisch untersucht wurde. Folgende Verfahren der Lagerung kamen zur Anwendung:

1. bei Kühlschranktemperatur ($+ 4^{\circ}\text{C}$) ohne Konservierungsmittel,
2. bei Zimmertemperatur ($+ 20^{\circ}\text{C}$ bis $+ 22^{\circ}\text{C}$) ohne Konservierungsmittel,
3. bei Zimmertemperatur mit Konservierungsmittel
 - a) bei Zusatz von Borsäure (1 : 200)
 - b) bei Zusatz von Cialit (1 : 10 000)
 - c) bei Zusatz von Merthiolat (1 : 25 000)
 - d) bei Zusatz von Formalin (1 : 1000).

Die erste bakteriologische Untersuchung sowie die Schalmprobe wurde sofort nach Verbringung der Milch in die Probeflaschen vorgenommen, wobei die übliche Ausstrichmethode zur Anwendung kam.

Einfluß auf die Schalmreaktion:

Insgesamt kamen 1118 Viertelgemelke in allen Schalmwerten zur Unter-

suchung. Die Proben lagerten unter den oben erwähnten Bedingungen, wobei sie 5 Tage lang täglich auf ihren Schalmwert überprüft wurden.

Untersucht wurden:

- 185 Viertelgemelke bei Kühlschranktemperatur ($+ 4^{\circ} \text{C}$) ohne Konservierungsmittel,
- 285 Viertelgemelke bei Zimmertemperatur ohne Konservierungsmittel
- 233 Viertelgemelke mit dem Zusatz von Borsäure,
- 220 Viertelgemelke mit dem Zusatz von Cialit,
- 195 Viertelgemelke mit dem Zusatz von Merthiolat.

4. 2. Vorversuche

4.2.1. Abhängigkeit des bakteriologischen Befundes von einer Euterwaschung

Da durch die Manipulationen des Probenehmens am Euter selbst, sowie durch die Bewegung der Tiere vermehrt Staubpartikel in die Luft gelangen können, wurde bei der im folgenden beschriebenen Versuchsordnung geprüft, in welchem Umfang ~~der~~ Melkakt eine Verunreinigung der Milchprobe zu erwarten ist. Um den Einfluß einer Euterwaschung und Desinfektion zu ermitteln, wurden die Versuche sowohl am nicht desinfizierten als auch am desinfizierten Euter durchgeführt.

Da in Beständen mit mangelhafter Stall- und Melkhygiene eine besonders starke Staubbewegung zu erwarten ist, wurden zwei entsprechend schlechte Bestände für diese Versuche herausgegriffen.

Während Bestand A 30 Tiere umfaßte, von denen 23 mit Beta-toxinbildenden Staphylokokken infiziert waren, standen im Bestand B 20 Tiere, von denen 9 mit Streptococcus agalactiae befallen waren. In den Beständen war es üblich, vor dem Ansetzen der Melkbecher einen Strahl auf den Boden zu melken und das Euter anschließend mit einem trockenen Lappen abzuwischen. Somit war auf Euter- und Schenkelpartien eine umfassende Keimbesiedlung, möglicherweise auch von euterpathogenen Mikroorganis-

men, zu erwarten. Im einzelnen wurden die Versuche wie folgt durchgeführt:

Der Untersucher ergriff die Zitze der gegenüberliegenden Seite und brachte auf kürzestem Weg eine offene Blutplatte (Oberfläche: 56,8 cm²) unter die melkende Faust. War der Milchstrahl in ein darunter gestelltes Gefäß abgemolken, so wurde die Blutplatte gewendet und mit dem Glasdeckel verschlossen. Dieser Vorgang wurde an einem Hinter- und Vorderviertel vollzogen. Anschließend wurde das Euter mit einem Schaumstofftuch unter Verwendung von 9,5 %iger Sokrena 113-Lösung abgewaschen und der Vorgang wiederholt.

Die bei der Auswertung ermittelten Ergebnisse sind wie folgt aus Tabelle 1 zu entnehmen. Es kann hierbei festgestellt werden, daß in Bestand A sowie in Bestand B die Mittelwerte der gewachsenen Kolonienzahlen vor der Eutersäuberung annähernd das 2,4fache des Mittelwertes nach der Euterdesinfektion beträgt. Auffallenderweise ist in keinem Fall eine Kolonie von Beta-toxinbildenden Staphylokokken beziehungsweise Galt-Streptokokken auf der Blutplatte angewachsen.

Tabelle 1: Einfluß der Säuberung des Euters auf die Keimzahl

Tier Nr.		1		2		3		4		5		6		Mw
		v.	h.	v.	h.	v.	h.	v.	h.	v.	h.	v.	h.	
Bestand A	Zahl d. Pk.	50	30	45	55	14	31	18	35	43	33	45	55	37,8
	o. D.													
	Zahl d. Pk.	17	5	12	20	11	11	12	20	18	13	39	17	15,6
	m. D.													
	Zahl d. Pk.	20	17	62	19	36	10	7	11	39	36	12	-	24,5
	o. D.													
Bestand B	Zahl d. Pk.	11	18	10	6	12	11	21	3	2	13	3	-	10
	m. D.													

v. = vorne

h. = hinten

o. D. = ohne Desinfektion

m. D. = mit Desinfektion

Pk. = Plattenkolonien

4.2.2. Einfluß von Schüttelbewegung während des Transports auf die Schalmreaktion bei kleiner und großer Milchmenge.

Da bei der routinemäßigen Probenentnahme die Milchproben bis zu 8 Stunden beim Transport einer fortgesetzten Schüttelbewegung ausgesetzt sein können, wurde der Einfluß des Schüttelns auf die Schalmreaktion im Labor untersucht. 37 Proben wurden entnommen und eine halbe Stunde später der Schalmprobe im Labor unterzogen. Von jeder im Stall entnommenen Milchprobe (60 ml) wurden 2 Flaschen mit 20 ml-Füllung und 2 Flaschen mit 5 ml-Füllung versehen. 2 Flaschen von je einer Füllungsgröße wurden auf den Schüttelapparat gestellt, die andere Hälfte lagerte ruhig bei Zimmertemperatur. Nach 8 Stunden wurde die Schalmprobe durchgeführt. Der Tabelle 2 kann entnommen werden, daß der Grad der Schalmreaktion in keinem Fall erhöht wurde. Ein Absinken wurde nach ruhiger Lagerung bei großer Milchmenge in 9, bei kleiner Milchmenge in 10 Fällen beobachtet. Proben, die nach Einwirkung von Schütteln geprüft wurden, zeigten mit Ausnahme einer Probe dasselbe Verhalten. Der Schalmwert zeigte in keinem Falle ein Absinken um mehr als eine Schalmstufe.

Da aus diesem Versuch zu entnehmen ist, daß die Schüttelbewegung innerhalb 8 Stunden ohne Einfluß bleibt, jedoch möglicherweise die Milchmenge bedeutungsvoll ist, wurde an weiteren 57 Proben geprüft, ob nach 8-stündiger Lagerung bei 5 ml Milchmenge eher als bei 20 ml Milchmenge ein Absinken der Schalmreaktion zu bemerken ist. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Die Tabelle zeigt, daß die Schalmreaktion unabhängig von der Milchmenge schwächer wird.

Tabelle 2: Einfluß von Lagerung und Schütteln auf die Schalmreaktion

		Nach 8 Stunden ruhiger Lagerung						Nach 8 Stunden Schüttelbewegung					
Zahl der Proben		20 ml			5 ml			20 ml			5 ml		
		=	<	>	=	<	>	=	<	>	=	<	>
++++	5	4	1		4	1		4	1		4	1	
+++	9	6	3		3	6		5	4		4	5	
++	2	2			2			2			2		
+	9	5	4		6	3		4	5		4	5	
±	8	7	1		6	2		8			7	1	
0	4	4			4			4			4		
Total	37	28	9		25	12		27	10		25	12	

Tabelle 3: Einfluß der Probengröße auf die Schalmreaktion bei Lagerung

			0	±	+	++	+++	++++
Anzahl der Proben 1 Std. nach Entnahme			20	8	6	5	14	4
Schalmreaktion nach 8 Std.	20 ml	=	20	6	4	4	9	4
		<		2	2	1	5	
Lagerung bei Zi.temp.	5 ml	=	20	6	4	4	9	4
		<		2	2	1	5	

Zeichenerklärung für Tab. 2 und 3:

- = = der ursprünglichen Reaktion gleich
- < = schwächer als die ursprüngliche Reaktion
- > = stärker als die ursprüngliche Reaktion

Tabelle 4a: Verhalten der Keimzahl bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlicher Milchmenge in Viertelgemelksproben, aus denen hämatoginbildende Staphylokokken isoliert wurden.

Keimzahlen in 100/ml

	Milchmenge: 20 ml					Milchmenge: 5 ml				
Stunden	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8
+ 4° C	18	22	20	17	18	10	22	12	24	16
	44	38	20	36	40	30	48	32	32	30
	60	40	46	56	60	42	50	36	32	26
	8	6	8	8	6	4	4	8	2	10
	24	30	40	29	24	26	42	30	18	20
	18	30	32	37	22	16	20	20	20	28
	62	66	82	45	30	30	46	54	52	43
	18	22	24	20	20	12	18	26	32	18
	28	42	45	30	42	36	35	38	36	38
	71	75	50	66	70	10	68	53	51	50
Mittelwert	35,1	37,1	38,1	34,4	32,7	24,6	35,3	30,1	29,9	27,9
+20° C	12	14	21	16	22	10	18	12	14	12
	42	42	44	72	50	36	25	32	44	42
	42	52	22	48	48	26	18	28	44	44
	10	8	8	8	9	4	8	4	6	6
	32	44	44	51	53	26	22	28	22	32
	16	12	14	16	14	12	18	16	16	14
	46	66	56	78	74	58	55	66	34	50
	44	35	29	36	30	22	24	20	18	34
	48	46	46	56	52	36	26	28	40	38
	50	60	60	70	68	46	70	61	41	43
Mittelwert	34,2	37,9	32,4	44,3	42,0	27,6	28,6	29,5	27,9	25,9
+25° C	14	14	10	16	30	14	10	23	18	64
	36	36	36	54	107	38	38	24	28	40
	43	50	30	48	48	46	42	42	38	70
	2	2	9	10	8	8	6	12	4	8
	36	34	28	35	32	26	34	30	20	50
	26	18	22	20	18	18	6	12	6	8
	70	62	64	70	76	38	50	61	46	52
	26	32	36	40	52	18	16	21	20	54
	50	44	40	43	50	40	38	56	52	100
	70	40	48	60	50	52	45	52	44	75
Mittelwert	34,7	33,2	32,3	39,6	39,5	29,8	28,5	32,9	24,8	52,1
+30° C	16	16	76	45	350	18	16	48	124	500
	48	36	52	130	650	36	28	138	300	800
	48	44	68	86	400	44	28	30	168	360
	4	5	4	10	60	8	4	4	4	8
	21	42	100	120	520	24	22	70	192	500
	17	14	12	26	40	14	8	6	36	42
	34	60	120	180	600	56	60	50	74	600
	29	18	30	110	350	20	20	30	81	400
	26	42	62	60	450	36	32	24	120	600
	62	61	69	70	400	36	42	54	130	450
Mittelwert	30,5	33,8	59,3	83,7	382,0	29,2	26,0	45,4	122,9	426,0

Tabelle 4b: Verhalten der Keimzahl bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlicher Milchmenge in Viertelgemelksproben, aus denen *Streptococcus agalactiae* isoliert wurde.

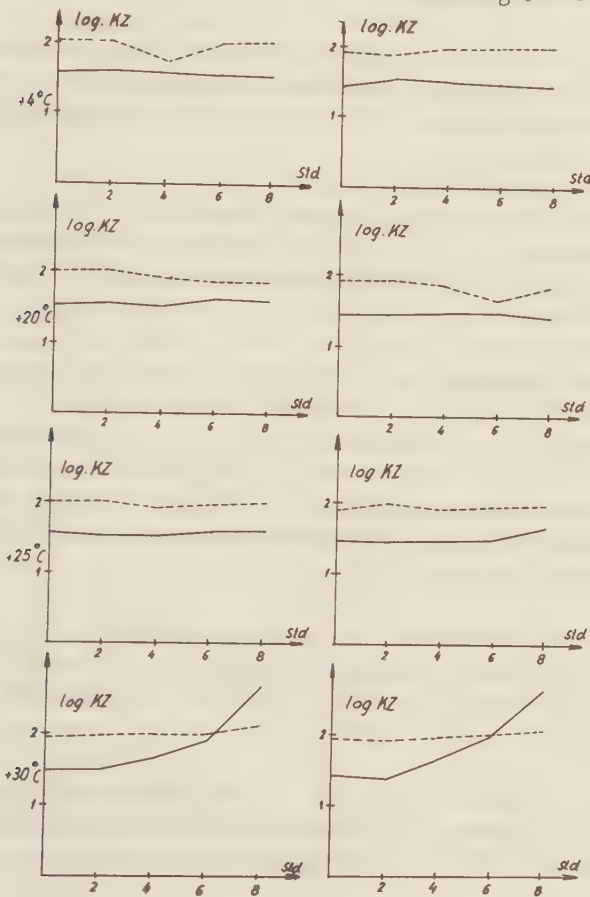
Keimzahlen in 100/ml

	Milchmenge: 20 ml					Milchmenge: 5 ml				
Stunden	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8
+ 4° C	150	160	175	140	171	160	167	175	172	185
	11	13	24	12	18	6	7	12	4	13
	8	9	16	16	10	14	10	14	9	9
	6	5	12	11	8	4	5	6	7	8
	6	8	18	10	11	10	16	16	8	9
	42	75	45	55	41	82	47	86	64	47
	265	257	122	210	233	218	168	236	296	263
	370	370	320	310	346	219	260	309	340	320
	45	142	54	105	92	85	44	85	58	91
Mittelwert	97,5	107,7	54,1	93,0	99,5	83,5	76,4	98,6	100,4	97,9
+20° C	146	182	174	191	173	166	235	173	121	125
	10	10	14	8	16	8	9	6	8	2
	8	12	8	6	7	8	18	6	5	2
	8	8	8	7	5	6	10	2	4	10
	4	8	3	6	7	2	8	5	3	5
	84	31	94	67	62	76	94	55	68	51
	230	298	144	187	215	271	145	164	119	350
	317	390	254	147	123	205	218	259	97	128
	86	95	77	77	102	71	78	54	13	17
Mittelwert	98,7	106,9	81,5	72,6	73,9	82,7	84,5	73,4	44,8	71,0
+25° C	160	185	140	180	145	203	226	150	110	105
	20	4	3	2	10	8	10	14	10	13
	22	18	6	8	8	30	13	8	16	10
	12	7	3	4	26	8	6	2	2	11
	10	8	4	10	10	8	7	6	8	9
	47	39	41	56	70	36	90	34	27	30
	284	119	286	400	550	230	255	260	400	500
	249	550	214	167	104	195	243	241	184	96
	92	85	38	57	97	48	76	66	61	170
Mittelwert	95,8	107,5	77,0	90,0	103,1	78,9	97,8	82,9	92,8	101,4
+30° C	185	168	140	145	250	120	160	142	128	137
	20	10	9	2	10	11	18	12	16	80
	17	15	9	2	13	6	4	6	5	7
	7	6	8	6	10	14	6	4	3	9
	12	22	8	2	8	18	6	4	6	7
	63	85	36	47	104	55	32	37	31	140
	250	248	455	480	550	260	147	345	510	620
	260	332	248	211	220	232	302	264	280	253
	26	36	86	168	175	84	42	102	103	146
Mittelwert	92,7	99,2	101,2	107,7	139,0	87,3	75,0	53,2	109,0	143,2

Abbildung 1: Keimwachstum in verschieden großer Milchmenge

Milchmenge: 20 ml

Milchmenge: 5 ml



————— Beta-hämolytische Staphylokokken
- - - - - Streptococcus agalactiae

4.2.3. Keimvermehrung bei verschiedenen Temperaturen in kleiner und großer Milchmenge

Die in das Labor eingelieferten Milchproben zeigen häufig starke Schwankungen in der Milchmenge. Das Ziel dieses Versuches war es, festzustellen, in wieweit die Keimvermehrung bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit steht zur Milchmenge.

Die Proben wurden in zwei Beständen entnommen, wobei in einem Bestand gehäuft Galtinfektionen, im anderen Bestand Staphylokokkeninfektionen gefunden wurden. 10 infizierte Viertelgemelksproben gelangten aus jedem Bestand zur Untersuchung.

In einem 200 ml Glaskolben wurden 100 ml Milch im Stall ohne vorherige Desinfektion der Zitzenspitze gewonnen und gelangten nach einer halben Stunde in das Labor. Dort wurde jedes Viertelgemelk in einer Menge von 20 ml und 5 ml auf je 4 Portionen verteilt. Die 20 ml-Menge wurde hierbei in die üblichen Probeflaschen, die 5 ml-Menge dagegen in Reagenzröhrchen pipettiert. Als Lagerungstemperatur wurden $+ 4^{\circ} \text{C}$, $+ 20^{\circ} \text{C}$, $+ 25^{\circ} \text{C}$, und 30°C gewählt.

Die bakteriologische Untersuchung erfolgte durch Ausstrich mit der Platinöse (0,01 ml) gut durchgeschüttelter Milch auf einer geviertelten Blutagarplatte. Jede Probe wurde fünfmal im Abstand von 2 Stunden auf den Keimgehalt geprüft.

In Tabelle 4 a, b sind die Keimzahlen im einzelnen aufgeführt und der Mittelwert der Keimzahl von 10 Proben herausgestellt. Abbildung 1 gibt eine graphische Darstellung mit Logarithmierung der Mittelwerte wieder.

4.2.4. Zur Beurteilung nicht eindeutig bakterieller Befunde

Bei dem Ausstrichverfahren mit der Platinöse (0,01 ml Milch) ist bei der Keimzahl von 500/ml damit zu rechnen, daß bei einzelnen Platten-
ausstrichen kein Kolonienwachstum zu verzeichnen ist.

Zur Prüfung der Frage, in wie weit die bakteriologische Diagnose [†] (1 - 5 Kolonien) reproduzierbar ist, wurde von 10 Milchproben mit unter 500 Keime/ml 20-mal je 0,01 ml Milch mit der Öse auf geviertelte Blutplatten ausgestrichen. Die Keimzahl einer Probe wurde durch Bestimmung des Mittelwertes aus der Kolonienzahl in 20 Ausstrichen ermittelt.

In der Tabelle 4c wird unter Einteilung der Keimzahlmittelwerte dargestellt, in welchem Umfang die Diagnosen nicht reproduzierbar sind, das heißt ein Kolonienwachstum nicht feststellbar war. Der Tabelle 4c ist zu entnehmen, daß der Prozentsatz der Reproduzierbarkeit positiver Resultate nach Ausstreichen einer Öse Milch auf Blutagar-nährboden bei Keimzahlen unter 100/ml 53,3 % ist, während er bei 100 - 300 Keimen 80 - 90 % und bei 400 - 500 Keimen praktisch 100 % beträgt.

Tabelle 4c: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse b, niedriger Keimzahl

Durchschnittl. Keimzahl/ml	<100	100-200	200-300	300-400	400-500	Total
Zahl der Proben	3	3	1	1	2	10
Bakt.Kult. positiv	32	49	18	20	39	158
Bakt.Kult. negativ	28	11	2	0	1	42
Reproduzierbar- keit %	53,5	81,7	90,0	100	99,8	79,0

4.2.5. Folgerungen aus den Vorversuchen

1. Da die Mittelwerte der festgestellten Keimkolonienzahlen nach Reinigung und Desinfektion des gesamten Euters nur 15,6 beziehungsweise 10 (siehe Tabelle 1) betragen, wird dadurch eine deutliche Reduzierung der Keimzahl am Ort der Probenentnahme erreicht. Die Möglichkeit einer Infektion der Milchprobe ist damit gegeben. Mit einer nennenswerten Verunreinigung ist allerdings nicht zu rechnen, vor allem wenn man beachtet, daß die festgestellten Keime auf einer Fläche von $56,8 \text{ cm}^2$ (Nährbodenoberfläche) ermittelt wurden, während die Öffnung der verwendeten Probeflasche nur $3,14 \text{ cm}^2$ beträgt, und zudem die Fläche durch Schräghalten (45°) um die Hälfte vermindert wird. Die Infektionsrate ist somit bei der Probenflasche ca. 36-mal kleiner als bei der Nährbodenplatte.

So ergibt sich für die Hauptversuche, daß auf eine Waschung und Desinfektion des gesamten Euters verzichtet werden kann.

2. Ein Einfluß der Schüttelbewegung oder der Milchmenge ist weder für den Ausfall der Schalmprobe noch für die bakteriologische Untersuchung feststellbar.
3. Bei Keimzahlen unter 100/ml Milch muß mit einer Fehlerrate von 46,7 % beim Ausstrich von 0,01 ml Milch gerechnet werden, während bei Keimzahlen zwischen 100 - 200/ml diese nur 18,3 % beträgt. Untersucht man Milchproben mit höheren Keimzahlen, so ist die Reproduzierbarkeit so gut, daß die mögliche Fehlerrate praktisch vernachlässigt werden kann. Da bei einer einmaligen Untersuchung nicht feststeht, in welchem Bereich die Keimzahl sich bewegt, muß bei einem positiven bakteriologischen $+$ Befund mit einem Fehler von annähernd $+\frac{1}{2}$ - 20 % gerechnet werden. Dieser Faktor ist bei den entsprechenden Versuchen zu berücksichtigen.

4. 3. Hauptversuche

4.3.1. Untersuchung der Gemelksfraktionen

Zur Prüfung der Frage, in wie weit innerhalb der Gemelksfraktionen Unterschiede bezüglich des Zell- und Keimgehaltes sowie der Schalmreaktion bestehen, wurde jeweils der 1., 2., 4. und 8. Strahl sowie das Endgemelk aus 100 Eutervierteln für die Bestimmung des Zellgehaltes, 148 Vierteln für die des Keimgehaltes und 345 Vierteln zur Beobachtung der Schalmreaktion untersucht. Die hierbei erzielten Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen 5 a, b, c, 6 und 7 sowie in den Abbildungen 3 a, b, c, 4 und 2 dargestellt.

Hinsichtlich des Zell- und Keimgehaltes wird jeweils der Wert des 1. Strahls gleich 1 gesetzt und die Werte der übrigen Strahlen als Vielfaches (Faktoren) des Wertes des 1. Strahles angegeben. Die große Zahl der verschiedenen Faktoren macht ihre Darstellung in der Häufigkeitsverteilung notwendig. Die Variationsbreite ist in gleich große Intervalle eingeteilt, die durch Faktorengrenzen und Faktorenmitten (x) bestimmt sind. Die Anzahl der zu einer bestimmten Faktorenmitte gehörigen Faktoren ist die Frequenz f .

Berechnung des mittleren Faktors (F) (nur bei den Zellgehaltsuntersuchungen durchgeführt):

Hierzu wird jede Faktorenmitte mit der zugehörigen Frequenz multipliziert und die Summe dieser Produkte gebildet. Diese wird durch die Gesamtzahl der Beobachtungen (Summe der Frequenz) dividiert um das arithmetische Mittel der Faktorenmitten zu erhalten.

4.3.1.1. Zellgehalt

Die Frequenzen der Faktorenmitten des Leukozyten-, Epithel- und Gesamtzellgehaltes sind in den Liniendiagrammen (Abbildung 3 a, b, c) dargestellt. Der mittlere Faktor F der jeweiligen Strahlen ergibt sich aus Tabelle 5 a, b, c und wird in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Aus den Liniendiagrammen (Abbildung 3 a, b, c) kann entnommen werden:

Im Anfangsgemelk (1., 2., 4. und 8. Strahl) verhalten sich Leukozyten-, Epithel- und Gesamtzellgehalt in Frequenz und der hierbei engen Streuung sehr ähnlich. Das Diagramm zeigt, daß sowohl die Zahl der Epithelzellen wie auch die Gesamtzellzahl in hoher Frequenz das 0,75-fache (Faktorenmitte $x = 0,75$) der Zellzahl des ersten Strahles betragen. Die Leukozytenwerte des 2. und 4. Strahles liegen ebenfalls mit ihrer höchsten Frequenz bei Faktorenmitte $x = 0,75$, während sich im 8. Strahl das Frequenzmaximum auf $x = 0,25$ verschiebt. Im Endgemelk zeigt sich eine weite Streuung vor allem im Bereich der Faktorenmitte 1.

Aus den Darstellungen kann somit geschlossen werden, daß in den untersuchten Fraktionen des Anfangsgemelkes die Zellwerte niedriger als im 1. Strahl liegen. Im Endgemelk ist dagegen durchweg ein höherer Zellwert zu erwarten. Bei der weiten Streuung kann für den Zellgehalt des Endgemelkes keine besonders hervorragende Faktorenmitte angegeben werden, wenn auch am häufigsten mit dem 1,25- bis 2,75-fachen Wert des 1. Strahles zu rechnen ist.

In Abbildung 2 sind die mittleren Faktoren, sowohl des Gesamtzellgehaltes als auch des Epithel- und Leukozytengehaltes für die untersuchten Gemelksfraktionen dargestellt. Hierbei ist der mittlere Faktor im 2. Strahl höher, im 4. und 8. Strahl dem des 1. Strahles etwa gleichwertig, während für das Endgemelk der Trend zu einer hohen Zellzahl abzuleiten ist.

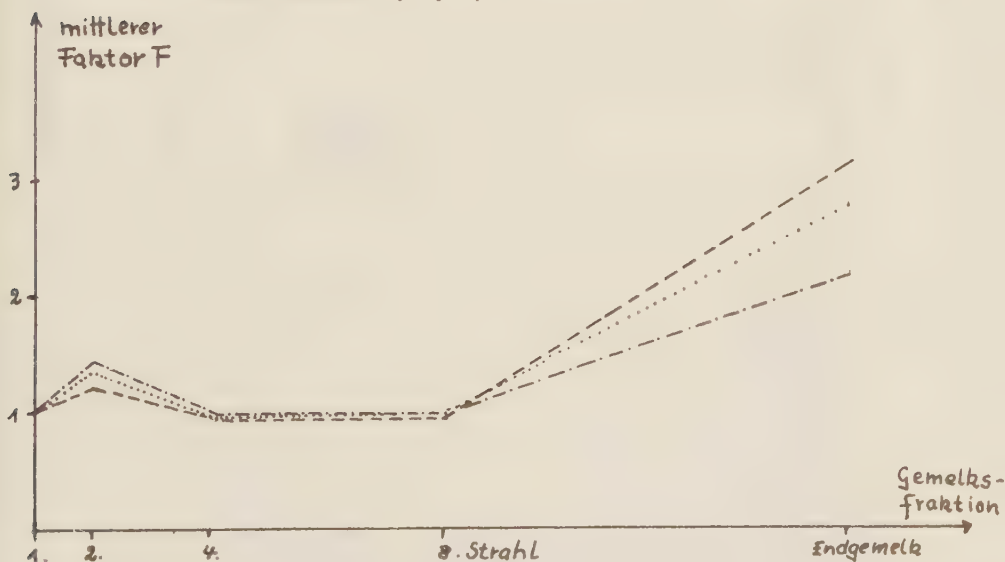
4.3.1.2. Schalmprobe

Die Auswertung der Schalmerngebnisse von 210 infizierten und 135 nicht infizierten Gemelken aus den oben erwähnten Gemelksfraktionen ist in Tabelle 6 eingetragen. Dabei wurde nach folgenden Gesichtspunkten vorgegangen:

Der Schalmwert des 1., 2., 4. und 8. Strahles sowie des Endgemelkes war entweder dem des 1. Strahles gleichwertig (D I) oder er variierte um eine oder mehrere Stufen. Bei den Variationen konnte entweder eine Verstärkung (+) oder eine Schwächung (-) beobachtet werden. Betrug diese nur eine Stufe, z. B. von ++ nach +++ oder von +++ nach ++, so wurde dies noch im Rahmen der Diagnose (D I) gewertet. Eine Verstärkung oder Schwächung über zwei oder mehr Stufen führte zur neuen Diagnose D II.

Bei infizierten Viertelgemelken wurden die folgenden Beobachtung gemacht: Während im 2. Strahl in 0,9 % die Diagnose D I nicht aufrecht erhalten wurde, variierte im 4. Strahl in 2,9 %, im 8. Strahl in 8,2 % und im Endgemelk in 32,8 % das Ergebnis der Schalmprobe um mehr als eine Stufe, so daß hier die neue Diagnose D II gestellt werden mußte. Im 2. Strahl war die geringe Zahl der Diagnosenänderungen (D II) auf Verstärkungen zurückzuführen. Im 4. Strahl trat als Ursache der neuen Diagnose D II in 0,5 % eine Verstärkung und in 2,4 % eine Schwächung der Schalmreaktion in Erscheinung. Entfielen im 8. Strahl 0,9 % auf Verstärkungen und 7,3 % auf Schwächungen, so läßt sich im Endgemelk in 0,9 % eine Schwächung und in 31,9 % dagegen eine Verstärkung nachweisen.

Abbildung 2: Zellgehalt in den Gemelksfraktionen
(graphische Darstellung des mittleren Faktors
aus Tabelle 5a, b, c)



Erklärung:

- Leukozyten
- .-.- Epithelzellen
- Gesamtzellgehalt

Tabelle: 5a

Gesamtzellgehalt der Gemislsfraktionen (Statistische Auswertung)

Faktoren- grenzen	Fakt.- mitte x	Fakt.- freq. ₂	x · f ₂	f ₄	x · f ₄	f ₈	x · f ₈	f _E	x · f _E
0,0 - 0,5	0,25	10	2,50	22	5,50	27	6,75	4	1,00
>0,5 - 1,0	0,75	45	33,75	47	35,25	40	30,00	11	8,25
>1,0 - 1,5	1,25	21	26,25	17	21,25	16	20,00	17	21,25
>1,5 - 2,0	1,75	12	21,00	7	12,25	6	10,50	12	21,00
>2,0 - 2,5	2,25	4	9,00	3	6,75	6	13,50	14	31,50
>2,5 - 3,0	2,75	1	2,75	3	8,25	1	2,75	14	38,50
>3,0 - 3,5	3,25	2	6,50					8	26,00
>3,5 - 4,0	3,75	2	7,50			2	7,50	3	11,25
>4,0 - 4,5	4,25	1	4,25					2	8,50
>4,5 - 5,0	4,75								
>5,0 - 5,5	5,25					1	5,25	4	21,00
>5,5 - 6,0	5,75					1	5,75		
>6,0 - 6,5	6,25			1	6,25			1	6,25
>6,5 - 7,0	6,75							1	6,75
>7,0 - 7,5	7,25							1	7,25
>7,5 - 8,0	7,75							1	7,75
>8,0 - 8,5	8,25							2	16,50
>8,5 - 9,0	8,75							1	8,75
>9,0 - 9,5	9,25	1	9,25					4	37,00
>9,5 - 10,0	9,75	1	9,75						
		Sf ₂ =100	Sf ₂ ·x= 132,50	Sf ₄ =100	Sf ₄ ·x= 95,50	Sf ₈ =100	Sf ₈ ·x=102,00	Sf _E =100	Sf _E ·x= 278,50
Mittlerer Faktor F			F ₂ = 1,325		F ₄ = 0,955		F ₈ = 1,02		F _E = 2,785

Abbildung 3a: Gesamtzellgehalt der Gemelksfraktionen
(Graphische Darstellung von Tabelle 5a)



Tabelle 5b: Epithelzellgehalt der Gemelsfraktionen (Statistische Auswertung)

Faktoren- grenzen	Fakt.- mitte x	Fakt.- freq. f ₂	x · f ₂	f ₄	x · f ₄	f ₈	x · f ₈	f _E	x · f _E
0,0 - 0,5	0,25	18	4,50	30	7,50	30	7,50	16	4,00
>0,5 - 1,0	0,75	33	24,75	34	25,50	38	28,50	17	12,75
>1,0 - 1,5	1,25	23	28,75	19	23,75	14	17,50	14	7,50
>1,5 - 2,0	1,75	12	21,00	6	10,50	7	12,50	13	22,75
>2,0 - 2,5	2,25	4	9,00	7	15,75	4	9,00	6	13,50
>2,5 - 3,0	2,75	1	2,75			2	5,50	6	16,50
>3,0 - 3,5	3,25	3	9,75	1	3,25	2	6,50	6	19,50
>3,5 - 4,0	3,75			1	3,75			3	11,25
>4,0 - 4,5	4,25	1	4,25			1	4,25	2	8,50
>4,5 - 5,0	4,75	1	4,75	1	4,75	1	4,75	2	6,50
>5,0 - 5,5	5,25	1	5,25			1	5,25	3	15,75
>5,5 - 6,0	5,75			1	5,75			4	23,00
>6,0 - 6,5	6,25							1	6,25
>6,5 - 7,0	6,75								
>7,0 - 7,5	7,25							1	7,25
>7,5 - 8,0	7,75								
>8,0 - 8,5	8,25	1	8,25						
>8,5 - 9,0	8,75								
>9,0 - 9,5	9,25								
>9,5 - 10,0	9,75	2	19,50					6	58,50
		Sf ₂ =100	Sf ₂ · x = 142,50	Sf ₄ =100	Sf ₄ · x = 100,50	Sf ₈ =100	Sf ₈ · x = 101,25	Sf _E =100	Sf _E · x = 223,50
Mittlerer Faktor F			F ₂ = 1,425		F ₄ = 1,005		F ₈ = 1,0125		F _E = 2,235

Abbildung 3b: Epithelzellgehalt der Gemelksfraktionen
(Graphische Darstellung von Tabelle 5b)



Tabelle 5c: Leukozytengehalt der Gemelksfraktionen (Statistische Auswertung)

Faktoren- grenzen	Fakt.- mitte $\bar{x}$	Fakt.- freq. f_2	$x \cdot f_2$	f_4	$x \cdot f_4$	f_8	$x \cdot f_8$	f_E	$x \cdot f_E$
0,0 - 0,5	0,25	11	2,75	31	7,75	40	10,00	6	1,50
0,5 - 1,0	0,75	45	33,75	39	29,25	29	21,75	7	5,25
1,0 - 1,5	1,25	19	23,75	10	12,50	11	13,75	13	16,25
1,5 - 2,0	1,75	9	15,75	9	15,75	8	14,00	18	31,50
2,0 - 2,5	2,25	4	10,00	3	6,75	4	10,00	11	24,75
2,5 - 3,0	2,75	8	22,00	5	13,75	4	11,00	7	19,25
3,0 - 3,5	3,25	3	9,75	1	3,25	1	3,25	9	29,25
3,5 - 4,0	3,75			1	3,75	1	3,75	5	18,75
4,0 - 4,5	4,25					1	4,25	2	8,50
4,5 - 5,0	4,75	1	4,75					4	19,00
5,0 - 5,5	5,25					1	5,25	2	10,50
5,5 - 6,0	5,75			1	5,75			2	11,50
6,0 - 6,5	6,25							1	6,25
6,5 - 7,0	6,75							1	6,75
7,0 - 7,5	7,25							2	14,50
7,5 - 8,0	7,75							1	7,75
8,0 - 8,5	8,25								
8,5 - 9,0	8,75								
9,0 - 9,5	9,25								
9,5 - 10,0	9,75							9	87,75
		$Sf_2=100$	$Sf_2 \cdot \bar{x}=122,50$	$Sf_4=100$	$Sf_4 \cdot \bar{x}=98,50$	$Sf_8=100$	$Sf_8 \cdot \bar{x}=97,00$	$Sf_E=100$	$Sf_E \cdot \bar{x}=319,10$
Mittlerer Faktor $\bar{F}$			$F_2 = 1,225$		$F_4 = 0,985$		$F_8 = 0,97$		$F_E = 3,191$

Abbildung 3c: Leukozytengehalt der Gemelksfraktionen
(Graphische Darstellung von Tabelle 5c)

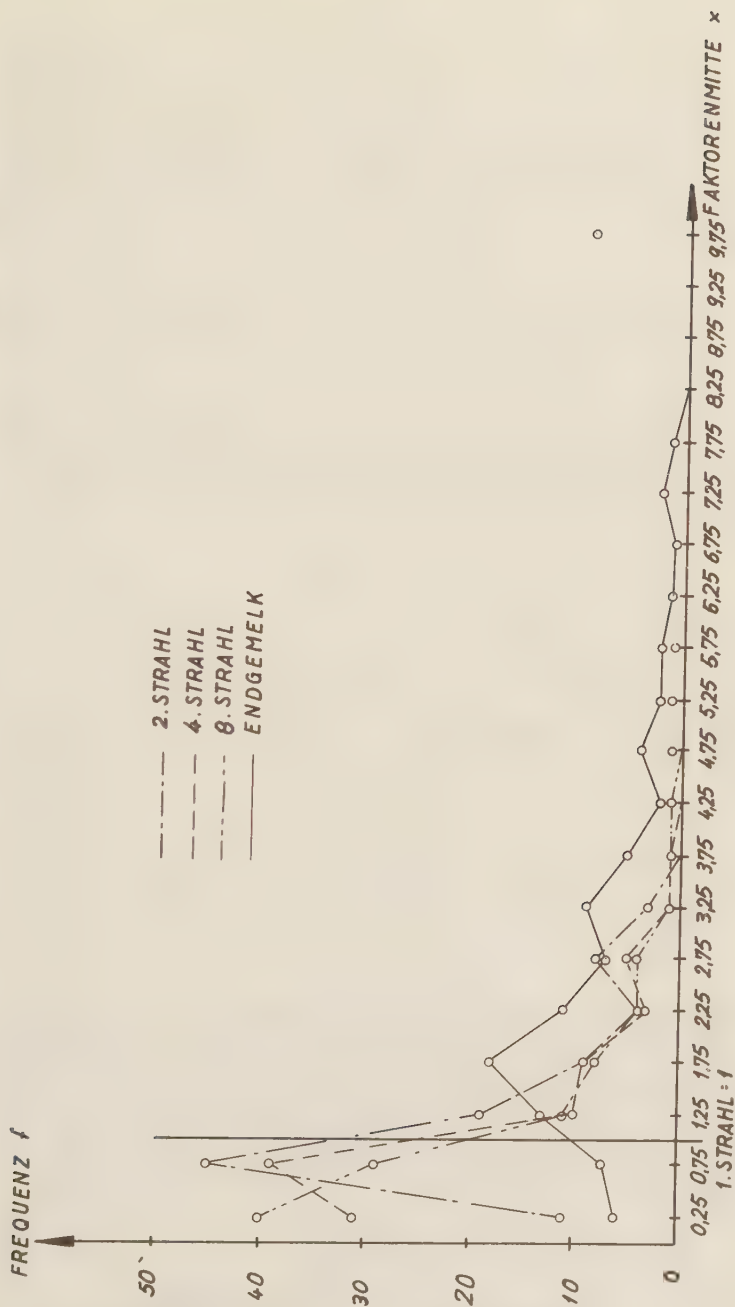


Tabelle 6: Abhängigkeit der Ergebnisse der Schalmprobe von der Gemelsfraktion

SCHALM- WERT		I STR.	2. STRAHL				4. STRAHL				8. STRAHL				ENDGEMEINK																									
			D I		D II		D I		D II		D I		D II		D I		D II																							
			=	+	-	TOTAL	=	+	-	TOTAL	=	+	-	TOTAL	=	+	-	TOTAL																						
⊖	54	52	2		54			53	1		54			48	5		53	1		1	27	16		43	11		11													
±	45	23	9	11	43	2		2	26	6	12	44	1		1	17	14	13	44	1		1	6	11	2	19	26	26												
+	24	18	2	4	24				12	3	7	22			2	2	9		10	19			5	3		1	4	20	20											
++	17	8	5	4	17				7	4	4	15			2	2	6	4	5	15			2	2	3	1	7	10	10											
+++	42	30	8	4	42				29	5	7	41			1	1	23	1	12	36			6	5	10	27	4	41	1	1										
++++	28	27	-	1	28				25		3	28					19		7	26			2	2	24		3	27	1	1										
TOTAL	210	158	26	24	208	2			2	152	19	33	204	1	5	6	122	24	47	193	2	15	17	73	57	11	141	67	2	69										
PROZENT			75,3	12,4	11,4	99,1	0,9		0,9	72,2	9,4	15,5		0,5	24	2,9	58	11,4	22,6	91,8	0,9	7,3	8,2	34,8	27,2	5,2	67,2	31,9	0,9	32,8										
⊖	102	101	1		102				102			102					99	3	102						54	33		87	15	15										
±	18	5	1	12	18				8	2	8	18					6		12	18					5	5	6	16	2	2										
+	5	4		1	5				4		1	5					2		1	3			2	2	1	4		5												
++	3	3			3				1	1	1	3					2			2			1	3	1	1	2		1	1										
+++	6	6			6				4		2	6					4		2	6					3	3		6												
++++	1	1			1				1			1					1			1					1			1												
TOTAL	135	120	2	13	135				120	3	12	135					114	3	15	132					3	3	65	46	6	117	17	1	18							
PROZENT			88,9	1,5	9,6	100			88,9	2,2	8,9	100					84,5	2,2	11,1	97,8					2,2	2,2	48,2	34,1	4,4	86,7	12,6	0,7	1	33						
			NICHT INFIZIERTE VIERTEL -																			INFIZIERTE VIERTELGEMEIKE																		
			GEMEIKE																																					

Bei nicht infizierten Viertelgemelken war im 2. und 4. Strahl keine Abweichung von der Diagnose D I, also um mehr als eine Stufe, zu verzeichnen, im 8. Strahl war dies in 2,2 % der Fall, wobei alle Fälle auf Schwächungen zurückzuführen waren. Im Endgemelk beruhten von 13,3 % Diagnosenänderungen 12,6 % auf Verstärkungen und 0,7 % auf Schwächungen.

Es muß hierzu bemerkt werden, daß sich alle Prozentzahlen auf die jeweilige Gesamtzahl der Proben infizierter bzw. nicht infizierter Viertel beziehen. Betrachtet man bei der Diagnose D II die jeweiligen Verhältnisse Verstärkung : Schwächung, so ergibt sich bei den infizierten Viertelgemelken im 4. Strahl ein Verhältnis 1 : 5, im 8. Strahl 1 : 7,5, im Endgemelk dagegen 33,5 : 1. Bei den nicht infizierten Viertelgemelkspuben ist für den 8. Strahl ein Verhältnis 0 : 3 und für das Endgemelk 17 : 1 zu verzeichnen.

4.3.1.3. Keimgehalt

Bei der statistischen Auswertung wurde wieder der oben beschriebene Faktor errechnet und die Faktorengrenze bestimmt. Die Gemelke aus insgesamt 148 Eutervierteln mit folgendem bakteriologischen Befund wurden ausgewertet: 30 Viertelgemelke mit *Streptococcus agalactiae*, 21 Viertelgemelke mit Streptokokken anderer Gruppen, 41 Viertelgemelke mit haemotoxinbildenden Staphylokokken, 56 Viertelgemelke mit Mikrokokken.

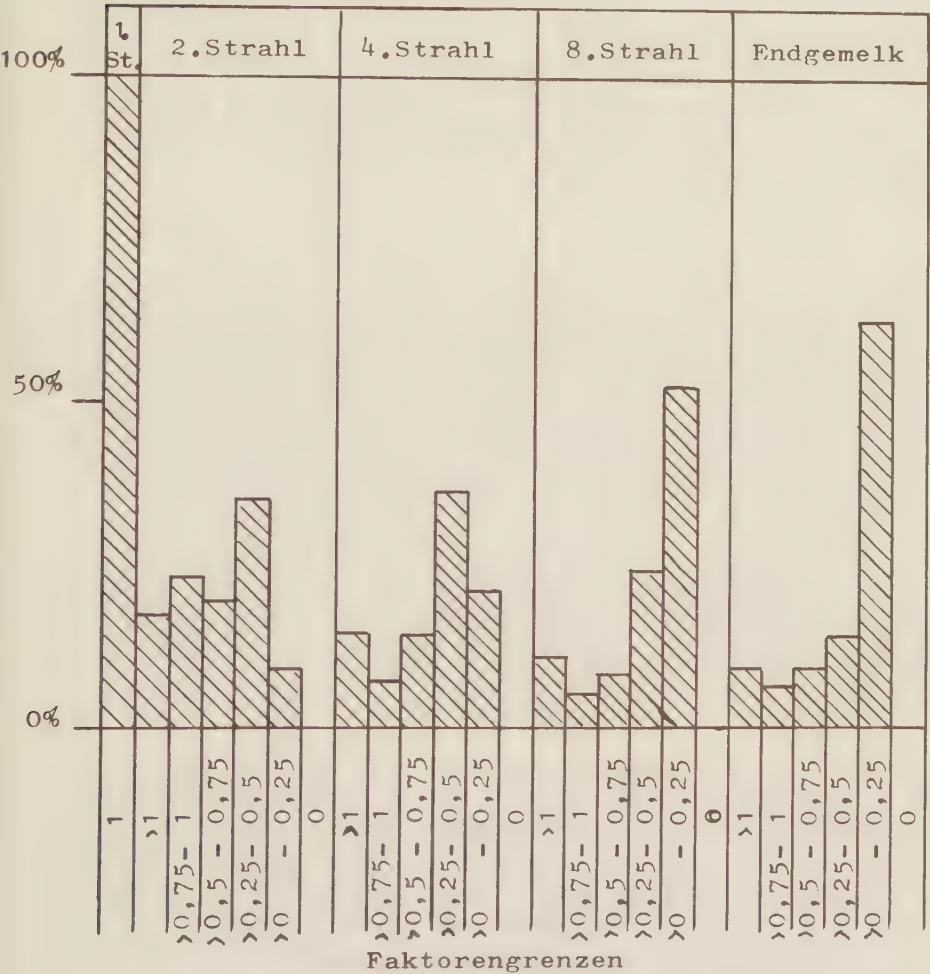
In Tabelle 7 sind die Versuchsergebnisse nach Faktorengrenzen aufgeteilt und unter Berücksichtigung des bakteriologischen Befundes dargestellt. Bei der prozentualen Auswertung sind alle Gemelke zusammengefaßt und in der graphischen Darstellung Abbildung 4 gemeinsam wiedergegeben.

Es ergab sich, daß im 2. Strahl in 60,8 % die Keimzahl 75 % und weniger des 1. Strahles betrug. Im 4. Strahl war dies bei 78,3 %, im 8. Strahl bei 84,4 % und schließlich im Endgemelk bei 85,8 % der Fall. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß der Keimgehalt im Verlauf des Gemelks, abgesehen von wenigen Ausnahmen, abnimmt. Dennoch konnte in allen Fällen im Endgemelk die bakteriologische Diagnose des Anfangsgemelkes bestätigt werden.

Tabelle 7: Keimgehalt in Abhängigkeit von der Gemelksfraktion.

		Zahl d. Ge- melke	Faktorengrenzen					0
			> 1	0,75-1,0	0,5-0,75	0,25-0,5	0-0,25	
2. Strahl	Strept.agal.	30	1	4	10	14	1	-
	path.Strept.	21	4	3	2	12	-	-
	häm.o.Staph.	41	6	13	9	9	4	-
	Mikrokokken	56	14	13	6	15	8	-
	Total	148	16,9%=25	22,3%=33	18,2%=27	33,8%=50	8,8%=13	-
60,8 %								
4. Strahl	Strept.agal.	30	1	1	7	9	12	-
	path.Strept.	21	5	-	3	9	4	-
	häm.o.Staph.	41	7	5	5	10	14	-
	Mikrokokken	56	9	4	6	21	16	-
	Total	148	14,9%=22	6,8%=10	14,2%=21	33,0%=49	31,1%=46	-
78,3 %								
8. Strahl	Strept.agal.	30	-	1	2	10	17	-
	path.Strept.	21	4	2	-	5	10	-
	häm.o.Staph.	41	3	1	7	9	21	-
	Mikrokokken	56	9	3	3	12	29	-
	Total	148	10,8%=16	4,7%=7	8,1%=12	24,3%=36	52,1%=77	-
84,4 %								
Endgemelk	Strept.agal.	30	1	1	-	2	26	-
	path.Strept.	21	4	1	2	4	10	-
	häm.o.Staph.	41	5	4	5	9	18	-
	Mikrokokken	56	3	2	6	6	39	-
	Total	148	8,8%=13	5,4%=8	8,8%=13	14,2%=21	62,8%=93	-
85,8 %								

Abbildung 4: Keimgehalt in Abhängigkeit von der Gemelksfraktion
(Graphische Darstellung von Tabelle 7)



4.3.1.4. Verhalten von Keim- und Zellgehalt sowie der Schalmprobe in Melk- und Zwischenmelkzeit.

Hierzu wurden Erhebungen an 28 Eutervierteln gemacht. Die Viertelgemelksproben wurden zur Morgenmelkzeit (aus Anfangs- und Endgemelk) sowie im Verlauf des Tages in dreistündigen Abständen bis zur Abendmelkzeit (aus Anfangs- und Endgemelk) entnommen. Die Untersuchungen im Labor erstreckten sich auf bakteriologische Beurteilung, Bestimmung des Keimgehaltes, die Zellzahlschätzung im Sediment und die Schalmprobe. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Zellgehalt:

Bei einem großen Teil der Untersuchungen ergab sich, daß ein Euterviertel mit einem niedrigen Zellgehalt (0-5 Zellen pro Gesichtsfeld) vom Morgenanfangsgemelk bis zum Abendendgemelk keine merkbaren Schwankungen zeigten. Hingegen traten ebenso wie in obigen Versuchen, Euterviertel auf, die im Morgendendgemelk eine starke Zellzahlerhöhung gegenüber dem Anfangsgemelk aufwiesen (Tabelle 8, Nr. 3-9, 18 und 27). In letzteren Fällen war ein Sinken der Zellzahl im Verlauf der Zwischenmelkzeit zu beobachten, wobei am Nachmittag bis zum Abendanfangsgemelk sich die niedrigsten Werte ergaben. Im Abendendgemelk stieg die Zellzahl wieder an. In anderen Eutervierteln (Nr. 2, 12, 13, 27, 28) wurde ein Ansteigen der Zellzahl innerhalb der Zwischenmelkzeit registriert. Diese Zellzahlerhöhung konnte sich im Abendendgemelk fortsetzen (Nr. 2, 12) oder im Gegensatz dazu, eine Senkung erfahren, (Nr. 13, 27, 28).

Schalmprobe:

Bei Anwendung der Schalmprobe ergaben sich ähnliche Beobachtungen. Wurden im Anfangs- und Endgemelk keine wesentlich unterschiedlichen Schalmreaktionen festgestellt, so zeigten sich auch in der Zwischenmelkzeit gleichmässige Werte. Dies galt sowohl für Euterviertel mit niedriger Schalmreaktion als auch für solche mit hoher Schalmreaktion (Nr. 3, 9, 27, 28). Bei anderen Fällen hingegen trat im Endgemelk der Morgenmelkzeit ein starker Anstieg der Schalmreaktion gegenüber dem Anfangsgemelk auf. Im Verlauf der Zwischenmelkzeit sanken diese erhöhten Schalmwerte graduell verschiedenen (Nr. 1, 2, 4-8, 12, 14). Eine Ausnahme bildet der Fall Nr. 18 wo der Schalmwert innerhalb der Zwischenmelkzeit anstieg.

Keimgehalt:

In Bestätigung obiger Versuche wurde im Morgenendgemelk eine gegenüber dem Anfangsgemelk niedrigere Keimzahl festgestellt. Diese Keimzahl stieg bei infizierten Vierteln im Verlauf der Zwischenmelkzeit bis zum Abendanfangsgemelk an (Nr. 1, 2, 4, 8, 10, 11). Bei Nr. 9 und 21 wurde schon um 9 Uhr ein sprunghafter Anstieg des Keimgehaltes gegenüber dem vorangegangenen Endgemelk festgestellt. In anderen Fällen variierten die Keimzahlhöchstwerte sehr stark (Nr. 8, 13, 18, 21).

4.3.2. Probenentnahme mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze

Aus 720 Eutervierteln kam je eine mit (Probengruppe I) und eine ohne (Probengruppe II) Desinfektion entnommene Milchprobe zur Untersuchung. Die Proben wurden sofort nach Eintreffen im Labor (etwa 2-3 Stunden nach der Entnahme im Stall), nach 10 Stunden und nach 24 Stunden einer bakteriologischen Untersuchung unterzogen. Die Proben lagerten 24 Stunden bei Zimmertemperatur (20-22° C) um den Praxisbedingungen bei verzögertem Transport zu entsprechen.

Bei der Auswertung wurde zwischen spezifischem und unspezifischem Keimwachstum unterschieden. Als spezifische Keime wurden bezeichnet: ~~Galt~~-streptokokken, streptokokken übriger Gruppen, Staphylokokken und Mikrokokken. Bei der bakteriologischen Diagnosestellung wurde die Zahl der Plattenkolonien festgehalten. Für das im folgenden Dargestellte ist jedoch nur zwischen einem $\pm$ und $> \pm$ Wachstum unterschieden.

Der Begriff "unspezifische Keime" erfaßte Plattenkolonien, die sich innerhalb eines Milchausstriches in Gestalt, Oberfläche, Größe und Färbung stark unterschieden. Außerdem wurden zur Gruppe der unspezifischen Keime coliforme Keime, Milchsäurestreptokokken und Corynebakterien (*C. bovis*) gezählt. Traten Streptokokken nach 24 Stunden in größerer Menge auf, und wurde ihre Aesculinspaltung ohne CAMP-Phänomen nachgewiesen, so konnte man sie mit großer Wahrscheinlichkeit als *Streptococcus lactis* ansprechen.

Tabelle 8: Keim- und Zellgehalt sowie die Schalmprobe in Melk- und Zwischenmelkzeiten.
I. Teil

Bakteriologische Untersuchung										Zellzahl-schätzung im Sediment (Zellen pro Gesichtsfeld)										Schalprobe									
Nr.	6 Uhr		9 Uhr	12 Uhr		15 Uhr	18 Uhr		6 Uhr		9 Uhr	12 Uhr		15 Uhr	18 Uhr		6 Uhr		9 Uhr	12 Uhr		15 Uhr	18 Uhr						
	AG	EG		AG	EG		AG	EG	AG	EG		AG	EG		AG	EG	AG	EG		AG	EG		AG	EG	AG	EG			
1	155 S	17 S	49 S	300 S	250 S	400 S	8 S	2 - 3	5-7	2-3	0-2	2-3	0-2	2-3	0-2	12-15	+	++	++	++	++	++	++	++					
2	236 S	24 S	33 S	42 S	88 S	89 S	7 S	0-2	2-4	2-3	6-7	10-12	10-24	25-30	+	+++	++	++	++	++	++	++	++						
3	13 S	7 S	4 M	67 S	32 S	10 S	2 S	15-20	100	100	100	100	50-70	100	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++						
4	300 S	50 S	89 S	300 S	300 S	250 S	39 S	0-2	18-25	10-15	8-10	9-13	0-2	15-25	+	++++	++	++	+	+	+	+	+						
5	23 S	9 S	21 S	42 S	26 S	11 S	3 S	12-15	30-40	8-10	6-10	0-2	3-5	6-10	+	+++	+++	+++	+	+	+	+	+						
6	20hS	42hS	28hS	49hS	45hS	13hS	3hS																						
7	3 S	1 M	10 S	11 S	18 S	6 M	1 M	5-7	100	12-15	3-4	0-2	2-4	30-40	0	++++	+++	++	+	+	+	+	+						
8	4 S	10 S	+	1 S	5 S	19 S	15 S	9-13	10-12	4-5	2-6	0-2	7-9	40-50	0	++++	+++	++	+	+	+	+	+						
9	27 S	5 S	30 S	100 S	25 S	25 S	9 S	10-12	60-70	13-16	13-16	0-2	15-18	25-35	+	++++	+++	+++	+	+	+	+	+						
10	21 M	6 M	16 M	40 M	15 M	19 M	11 M																						
11	500 S	55 S	480 S	250 S	230 S	200 S	300 S	15-20	15-20	10-12	15-20	8-10	10-12	20-25	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++						
12	60 S	52 S	24 S	32 S	37 S	130 S	5 S	10-15	0-2	2-3	3-4	10-11	2-3	2-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
13	84 S	27 S	48 S	80 S	230 S	251 S	32 S	5-7	4-5	10-12	6-7	8-10	5-6	4-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
14	2hS	2 M	9 M	1hS	2 M	+	+	2-3	8-10	15-20	15-20	18-22	8-10	18-25	+	++++	+++	+++	+	+	+	+	+						
15	40hS	+	7hS	18hS	+	+	5hS	2-3	5-8	5-6	20-30	20-30	3-6	8-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
16	+	+	100 M	+	14 M	1 M	+																						
17	4 M	4 M	23 M	5 M	8 M	+	+	6-8	12-15	4-5	2-3	2-7	0-2	0-2	+	++++	+	+	+	+	+	+	+						

Tabelle 8:
II. Teil

Bakteriologische Untersuchung										Zellzahl-schätzung im Sediment (Zellen pro Gesichtsfeld)										Schalmprobe					
Nr.	6 Uhr		9Uhr	12Uhr	5Uhr	18 Uhr		6 Uhr		9Uhr	12Uhr	15Uhr	18 Uhr		6Uhr		9U.	12U.	5U		18 Uhr				
	AG	EG				AG	EG	AG	EG				AG	EG	AG	EG									
15	+	+	8hS	4hS	11hS	2hS	+	0-2	0-2	0-2	0-2	5-8	0-2	4-7	+	+	+	+	+	+	+				
16	+	+	+	+	3 M	+	+	3-5	3-5	3-4	4-5	8-10	5-6	6-8	+	+	+	+	+	+	+				
17	+	+	+	1 M	1 M	+	+	2-3	0-2	2-3	2-3	2-4	0-2	2-3	+	+	+	+	+	+	+				
18	12hS	2 M	2 M	2 M	5 M	2 M	3 M	15-20	20-30	8-10	6-8	12-15	2-3	14-18	+	+	+	+	+	+	+				
19	2 M	+	5 M	1 M	3 M	2 M	+	3-5	4-6	2-3	4-7	4-6	3-6	6-8	+	+	+	+	+	+	+				
20	+	1 M	+	+	+	5 M	1 M	4-5	2-3	5-7	0-2	0-2	0-2	10-13	+	+	+	+	+	+	+				
21	12hS	1hS	36hS	13hS	103hS	8hS	1hS	3-4	17-20	4-6	5-6	0-2	0-2	2-4	+	+	+	+	+	+	+				
22	1 M	1 M	8 M	50 M	3 M	+	+	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	+	+	+	+	+	+	+				
23	50hS	+	2 M	2 M	3 M	14hS	+	2-3	5-6	5-6	0-2	0-2	0-2	6-8	+	+	+	+	+	+	+				
24	5 M	3 M	1 M	1 M	9 M	10 M	+	2-4	0-2	0-2	0-2	0-2	2-3	9-12	+	+	+	+	+	+	+				
25	18 M	8 M	1 M	3 M	8 M	4 M	4 M	2-3	2-3	0-2	0-2	0-2	0-2	4-6	+	+	+	+	+	+	+				
26	2 M	21 M	11 M	9 M	20 M	1 M	1 M	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	2-5	4-5	+	+	+	+	+	+	+				
27	+	+	8 M	3 M	1 M	1 M	1 M	4-6	25-30	30-40	20-25	15-20	10-20	5-8	+	+	+	+	+	+	+				
28	31 M	+	1 M	1 M	5 M	+	1 M	8-10	8-10	25-30	40-60	18-25	3-5	8-12	+	+	+	+	+	+	+				

Erklärung: S = Streptokokken
M = Mikrokokken
AG = Anfangsgemerk
hS = hämoxinbildende Staphylokokken
+ = negativ
EG = Endgemerk

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen 9/10 und in der graphischen Darstellung Abbildung 5 ausgewertet. Die Probengruppen I und II sind hier unter Berücksichtigung ihres bakteriologischen Befundes summarisch einander gegenübergestellt (Spalte A - Spalte B). Die in Klammer gesetzten Zahlen drücken die Anzahl der darin enthaltenen $\pm$ Befunde aus. Die Differenz der positiven Befunde in Gruppe II und derjenigen in Gruppe I ist besonders dargestellt (Spalte C). Eine negative Differenz bedeutet, daß in Gruppe II weniger positive Befunde erzielt wurden als in Gruppe I, umgekehrt wurden bei positiver Differenz in Gruppe I weniger positive Befunde festgestellt. Da jedoch in der Tabelle 9 nur die Summen berücksichtigt wurden, ist es notwendig, die Befunde weiter aufzuschlüsseln, um die Befunde in den einzelnen Gruppen, jeweils unter Berücksichtigung der Ergebnisse in den anderen Gruppen, darzustellen (Spalte D).

Bei der Untersuchung der 24 Stunden gelagerten Milch traten teilweise Überwucherungen mit unspezifischen Keimen auf, welche eine Diagnosestellung unmöglich machten. War in solchen Fällen in der Probe bei vorangegangenen Untersuchungen ein Wachstum mit spezifischen Keimen beobachtet worden, so wurde eine Eintragung in der letzten senkrechten Spalte (E) vorgenommen.

Aus Tabelle 9 und Abb. 5 sind folgende Feststellungen abzuleiten: Die Streptokokkenbefunde konnten annähernd in allen Fällen auch nach Desinfektion der Zitzenspitze bestätigt werden. Nicht bestätigte sich dagegen der Befund in 10 % der Fälle bei haemotoxinbildenden Staphylokokken nach 2-3 Stunden, in 8 % nach 10 Stunden und in 7 % nach 24 Stunden Lagerung der Milch bei Zimmertemperatur. Bei Mikrokokken war nach 2-3 Stunden Lagerung in 34 %, nach 10 Stunden in 32 % und nach 24 Stunden in 26,0 % keine Übereinstimmung der bakteriologischen Befunde zu erzielen. Auffallend ist, daß der Anteil der $\pm$ Befunde bei Streptokokken am niedrigsten ist, bei haemotoxinbildenden Staphylokokken mit 7-10 % etwas höher liegt und bei den Mikrokokken etwa 50 % beträgt.

Erst bei einer 24 Stunden bei Zimmertemperatur gelagerten Milch erlaubte die Überwucherung mit unspezifischen Keimen, bei Streptokokken und bei haemotoxinbildenden Staphylokokken in einzelnen Fällen und bei Mikrokokken in rund ein Viertel der Proben, keine Diagnosestellung mehr.

Die Zahl der bakteriellen Überwucherung der Blutplatten ist bei den Proben mit Streptokokken und Staphylokokken in Gruppe II gleich, bei Mikrokokken annähernd gleich der Zahl in Gruppe I.

Tabelle 9: Summarischer Vergleich mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze gewonnener Viertelgemelksproben, aus denen spezifische Keime isoliert wurden.

Erklärung:

Gruppe I = ohne Desinfektion der Zitzenspitze gewonnene Milchproben

Gruppe II = mit Desinfektion der Zitzenspitze gewonnene Milchproben

In Klammer () gesetzte Werte = Anteil der bakteriologischen
+ Befunde.

SPÄTE		A	B	C	D				E		
LAGERUNG BEI ZIMMERTEMPORATUR		PROBENENTNAHM. OHNE MIT DESINFEK. DESINFEK.		DIFFERENZ	BEFUND				ÜBERWU. MIT UNSPEC. KEIM W.		
Zeit n. d. Proben- entnahme		GRUPPE I	GRUPPE II		II - I	in Gr. II (bei neg. Proben in Gr. I)		in Gr. I (bei neg. Proben in Gr. II)		I	II
						> ±	±	> ±	±		
2-3 Std.	STREP. AGALAC.	39 (1)	39 (1)	0							
	PATH. STREPT.	29 (3)	29 (4)	0							
	HÄMOT. STAPH.	104 (29)	90 (25)	-14 ≈ 10%			2	12			
	MIKROKOKKEN	157 (73)	104 (59)	-53 ≈ 34%		6	11	48			
10 Std.	STREP. AGALAC.	39 (3)	38 (1)	-1 ≈ 3%				1			
	PATH. STREPT.	28 (6)	29 (6)	+1 ≈ 4%		1					
	HÄMOT. STAPH.	109 (29)	100 (26)	-9 ≈ 8%		3	2	10			
	MIKROKOKKEN	144 (70)	99 (55)	-45 ≈ 32%	2	7	12	42			
24 Std.	STREP. AGALAC.	39 (1)	39								
	PATH. STREPT.	24 (3)	26 (3)	+2 ≈ 8%		2			3	3	
	HÄMOT. STAPH.	103 (29)	95 (20)	-8 ≈ 7%		5	4	9	8	8	
	MIKROKOKKEN	127 (58)	94 (25)	-33 ≈ 26%	1	12	24	23	34	33	

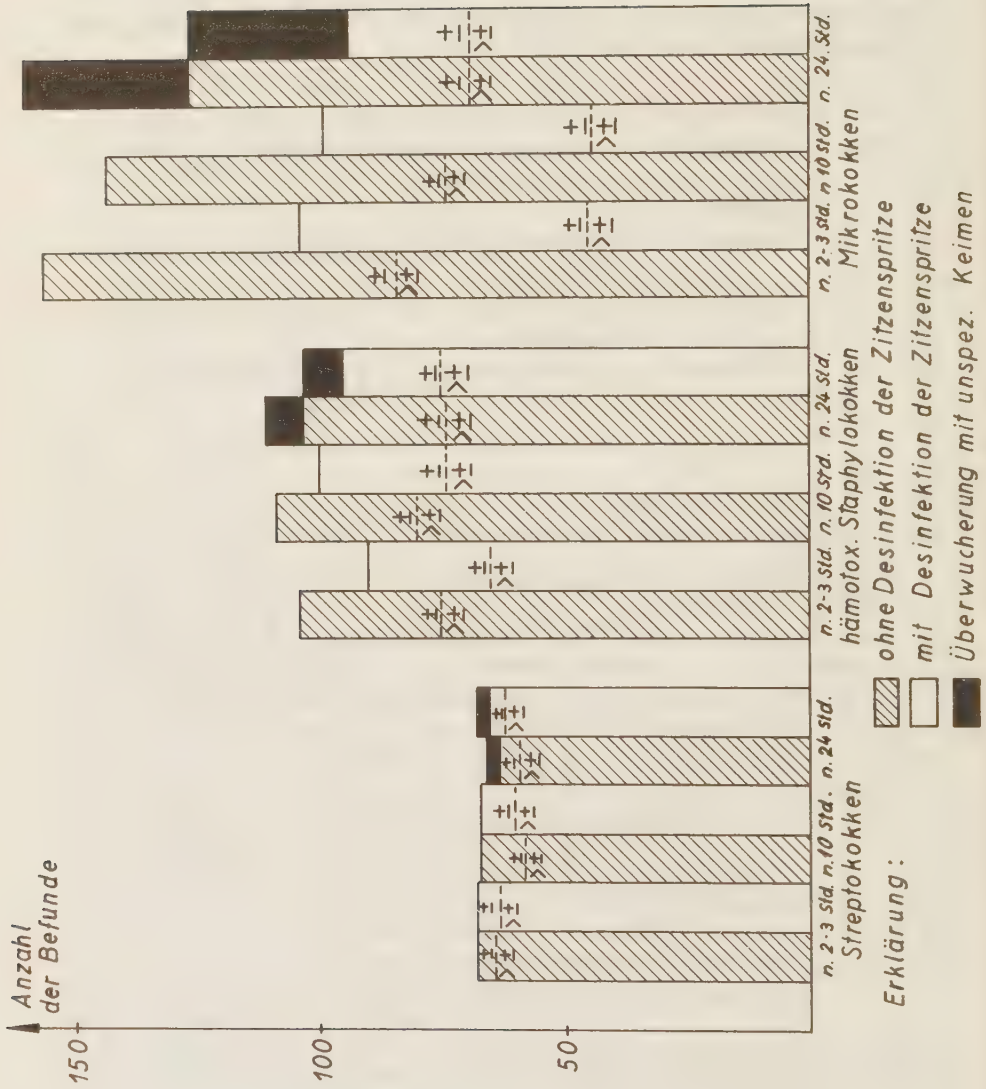


Tabelle 10 stellt eine Zusammenfassung der Befunde mit unspezifischen Keimen dar, wobei die graduellen Unterschiede Berücksichtigung finden. In den ersten 10 Stunden ist das Vorkommen von Rasenbildung (+++) ebensooft bei Gruppe I wie bei Gruppe II zu beobachten. Im Total ist in den ersten 10 Stunden bei Gruppe I häufiger ein Wachstum unspezifischer Keime festzustellen. Dies äußert sich nach 2-3 Stunden bei Gruppe I mit 13,5 % gegenüber Gruppe II mit 8,2 % und nach 10 Stunden bei Gruppe I mit 13,3 % gegenüber Gruppe II mit 10,8 %. Geht aus dem Total nach 24 Stunden kaum ein Unterschied der beiden Proben hervor, so ist eine Rasenbildung bei Gruppe I in 14,7 % gegenüber Gruppe II in 11,1 % festzustellen. Dagegen treten die ++ und die + Befunde in Gruppe II häufiger als in Gruppe I auf. So stehen 11,5 % ++ Befunde und 13,2 % + Befunde in Gruppe I 12,6 % ++ Befunden und 15,3 % + Befunden in Gruppe II gegenüber.

Tabelle 10: Vorkommen unspezifischer Keime in 720 Viertelgemelksproben, deren Entnahme mit und ohne Desinfektion der Sitzenspitze durchgeführt wurde. (Prozentuale Aufschlüsselung)

	Ohne Desinfektion Gruppe I (720 Proben)			Mit Desinfektion Gruppe II (720 Proben)		
	n. 2-3 Std. Lagerung	n. 10 Std. bei Zimmertemp.	n. 24 Std.	n. 2-3 Std. Lagerung	n. 10 Std. bei Zimmertemp.	n. 24 Std.
Unspez. Keime						
+	11 %	11,3 %	13,2 %	6,9 %	7,9 %	15,3 %
++	2,4 %	1,7 %	11,5 %	1,1 %	2,6 %	12,6 %
+++	0,1 %	0,3 %	14,7 %	0,1 %	0,3 %	11,1 %
Total	13,5 %	13,3 %	39,4 %	8,1 %	10,8 %	39,0 %

Erklärung: + = bis zu 10 unspezifische Plattenkolonien
 (bei Ausstrich von 0,01 ml Milch)
 ++ = mehr als 10 Plattenkolonien, aber ohne Rasenbildung
 +++ = Rasenbildung

4.3.3. Untersuchungen über den Einfluß der Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und des Zusatzes von Konservierungsmitteln auf den bakteriologischen Befund und die Schalmprobe.

4.3.3.1. Bakteriologischer Befund.

Im folgenden Versuch wurden Milchproben aus frischen Viertelgemelken entnommen. Um vergleichende Beobachtungen zu ermöglichen, wurde jede Viertelgemelksprobe (Anfangsgemelk) in 6 gleiche Milchproben aufgeteilt. Davon wurde eine Probe im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) gelagert und 5 Proben bei Zimmertemperatur über 5 Tage gelagert und in 24-stündigen Intervallen bakteriologisch untersucht, ob und inwieweit die bakteriologische Diagnose dabei beeinflusst werden kann. Von den bei Zimmertemperatur gelagerten Proben wurden einer Borsäure, der zweiten Cialit, der dritten Merthiolat und der vierten Formalin zugesetzt, während die 5. Probe ohne Konservierungsmittelzusatz verblieb.

Die Auswertung erfolgt unter folgenden Punkten:

1. Bis zu welchem Tag der darauffolgenden 4 Tage kann der bakteriologische Befund des ersten Tages durch weitere bakteriologische Untersuchungen bestätigt werden? (Tabelle 10/D)
2. Nach welcher Zeit kann eine bakteriologische Diagnose wegen starken Wachstums unspezifischer Keime oder wegen Zerstörung der Bakterienflora nicht mehr mit der angewandten Methode gestellt werden? (Tabelle 11/FD)

Eine Einteilung in 3 Untersuchungsgruppen (UG) nach Art der euterpathogenen Keime wurde als zweckmäßig betrachtet.

Aus den Ergebnissen in Tabelle 11 geht hervor:

- a) Für die Lagerung bei Kühlschrank- ($+4^{\circ}\text{C}$) und Zimmertemperatur ($20-22^{\circ}\text{C}$)

Bei der Lagerung von Proben ohne Konservierungsmittel bei Zimmertemperatur zeigte sich am Tag 1 unspezifisches Keimwachstum. Dieses Keimwachstum führte bei UG I in 17,0 %, bei UG II in 33,3 %, bei UG III in 0 % zu einer Überwucherung mit unspezifischen Keimen, was eine Diagnosestellung unmöglich machte. Ab dem Tag 3 waren über 79 % aller Proben aus diesem

Tag 4 negativer Befund auf. Wesentlich empfindlicher reagierten die hämotoxinbildenden Staphylokokken der UG II, in der am Tag 1 ein negativer Befund in 97,8 % und am Tag 4 in 100 % festgestellt wurde. Sehr ähnlich verhielt sich die UG III.

Formalin 1 : 1 000

Sämtliche Proben waren ab Tag 1 wegen Zerstörung der Keimflora nicht mehr auswertbar.

Tabelle 11: Einfluß verschiedener Lagerungsbedingungen und Konservierungsmittelzusätze auf die bakteriologische Diagnosestellung.

Erklärung zu Tabelle 11:

D = am Tag 0 gestellte und an den folgenden Tagen 1, 2, 3, 4 bestätigte Diagnose

FD = bakteriologische Diagnose D konnte nicht gestellt werden:

a) keimfr. = wegen negativem Befund auf dem Nährboden

b) überw. = wegen überwucherndem Wachstum unspezifischer Keime

() = in Klammer gesetzte Zahlen bedeuten Milchproben, die verloren gingen oder mangels Milch nicht angesetzt werden konnten.

UG = Untersuchungsgruppe

Kulturschrank (40°C)	Ohne Konservierungsmittel				Bei Zimmertemperatur				Merthiolat				Formalin	
	Zimmertemp.				Borsäure				Cialit				D	
	D	keimfr. überw.	D	keimfr. überw.	D	keimfr. überw.	D	keimfr. überw.	D	keimfr. überw.	D	keimfr. überw.	D	keimfr. überw.
0 100 %	48 (5)	-	53	-	53	-	51 (2)	-	53	-	50 (3)	-	50 (3)	-
1 100 %	48	-	44	9	50	1	51	-	53	-	50	-	50	-
2 100 %	41	-	23	17,0%	45	1,9%	3,8%	100%	53	-	50	-	50	-
3 84,4%	41	14,6%	4,4%	-	45	2	6	5	40	13	50	-	50	-
40	11	56,6%	4,9%	-	42	3,8%	11,3%	9,7%	26	27	50	-	50	-
3 83,3%	8	16,7%	20,7%	-	42	81,1%	1,9%	15,7%	49	0%	50	-	50	-
40	9	44	41	3	9	32	19	-	11	42	50	-	50	-
4 62,4%	2	33,2%	17,0%	-	77,4%	5,7%	17,0%	37,2%	20,8%	79,2%	45	-	100%	-
45	45	-	100%	-	41(4)	-	45	-	45	-	45	-	100%	-
45	30	56,7%	-	15	41	-	43	2	27	18	45	-	45	-
1 100 %	45	-	41	33,3%	100%	-	95,5%	4,5%	60,0%	40,0%	-	-	100%	-
2 100 %	15	-	33,3%	30	41	-	27	28	22	33	45	-	45	-
3 88,9%	5	6,7%	11,1%	40	38	-	60,0%	40,0%	26,7%	73,3%	-	-	100%	-
4 86,6%	4	8,9%	-	45	36	-	42,2%	57,8%	1	44	45	-	45	-
78(2)	80	-	100%	-	87,8%	-	12,2%	-	45	-	45	-	45	-
0 100 %	80	-	100%	-	80	-	80	-	80	-	80	-	80	-
1 100 %	80	-	100%	-	80	-	69	11	76	4	100%	-	100%	-
2 100 %	56	-	70,0%	24	80	-	86,3%	13,7%	95,0%	5,0%	-	-	100%	-
3 100 %	8	-	10,0%	30,0%	100%	-	57	23	45	35	80	-	80	-
4 100 %	2	-	2,5%	97,5%	98,7%	-	1,3%	98,7%	15,0%	85,0%	80	-	80	-

Tabelle 11:

4.3.3.2. Schalmprobe

118 Proben wurden insgesamt unter denselben Bedingungen wie unter 4.1.8. beschrieben gelagert und mit der Schalmprobe untersucht.

Ausgehend von der Schalmreaktion am Tag 0 wurde in 3 Beurteilungsstufen unterschieden:

- 1) gleiche Schalmreaktion wie am Tag 0
- 2) Schwächung der Schalmreaktion um eine Stufe
- 3) Fehldiagnose durch ein Sinken der Schalmreaktion um zwei und mehr Stufen.

In der Tabelle 12 a, b, c, d, e wurde in der waagerechten Spalte S das gesamte Material entsprechend obiger Einteilung summarisch erfaßt. Da Schwächungen und Fehldiagnosen in den Schalmstufen ++, +++ und ++++ eindeutiger zu beurteilen sind als + und ± Reaktionen wurden die > + Befunde getrennt in der darunterliegenden Spalte aufgeführt, prozentual ausgedrückt und die Fehldiagnosen in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

a) Lagerung bei Kühlschrank- ($+ 4^{\circ}\text{C}$) und Zimmertemperatur ($+ 20$ bis 22°C). Wurden im Kühlschrank am Tag 1 bei 0,9 % Schwächungen keine Fehldiagnosen festgestellt, so zeigte bei Zimmertemperatur die Schalmreaktion am Tag 1 in 32,4 % Schwächungen und 6,4 % Fehldiagnosen. Auch am Tag 2 ist ein geringes Nachlassen der Schalmreaktion im Kühlschrank mit 8,2 % Schwächungen und 5,4 % Fehldiagnosen zu beobachten, die entsprechenden Veränderungen äußerten sich bei Zimmertemperatur in 43,0 % Schwächungen und 29,5 % Fehldiagnosen. Wurde bei den in Zimmertemperatur gelagerten Proben am Tag 3 noch 14,3 % und am Tag vier 4,5 % gleichgebliebene Diagnosen ermittelt, so ergaben sich am Tag drei 66,4 % und am Tag vier 82 % Fehldiagnosen. Proben aus dem Kühlschrank behalten am Tag 3 bei 70,3 % und am Tag 4 bei 45 % ihre ursprüngliche Reaktion. Eine Fehldiagnose wurde in 9 % am Tag 3 und in 16,3 % am Tag 4 gestellt.

b) Lagerung bei Zimmertemperatur mit Zusatz von Konservierungsmitteln.
Borsäure 1: 200

Die Schalmreaktion dieser Proben wies am Tag eins 8,3 %, am Tag zwei 33,1 %, am Tag drei 65,5 % und am Tag vier 82,0 % Fehldiagnosen auf. Aus diesen Angaben sowie aus Abbildung 6 geht hervor, daß die Anzahl der Fehldiagnosen in annähernd gleichem Maße steigt, wie dies bei Zimmertemperatur ohne Konservierungsmittel festgestellt wurde.

Abbildung 6:

Auftreten von Fehldiagnosen bei der
 Schalmprobe während der Lagerung
 von Milchproben im Kühlschrank,
 bei Zimmertemperatur und nach Zusatz
 von Konservierungsmitteln (mit Werten
 aus Tab. 12a, b, c, d, e,).

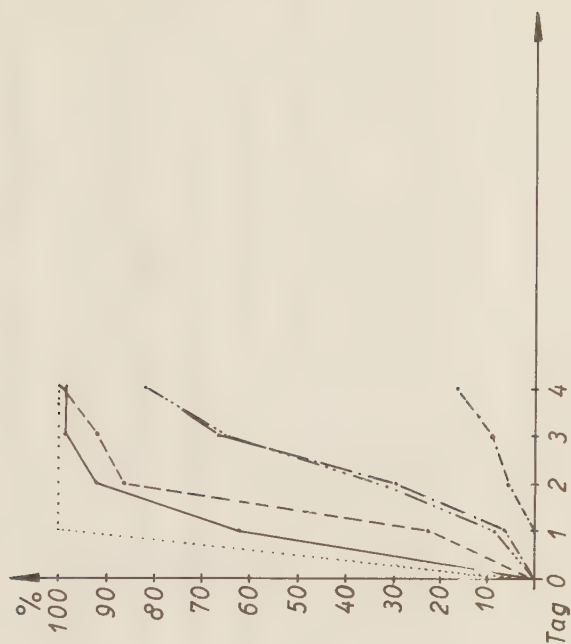


Tabelle 12a: Lagerung bei Kühlschranktemperatur (+4° C) ohne Konservierungsmittel

Schalm- probe	Tag 0			Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4		
	D	D		D	D		D	D		D	D		D	D	
		=	<		=	<		=	<		=	<		=	<
0	29	29			29			29			29			29	
+	37	37			37			37	1		36	1		33	4
+	8	8					5	3			2	5			7
++	18	18			17	1		17			10	7		3	13
+++	30	30			23	3		23	4		22	4		18	6
++++	63	62	1		56	5		56	2		46	12		29	24
S	185	184	1		165	14		165	6		145	29		112	54
>+	111	110	1		96	9		96	6		78	23		50	43
>+ %	100 %	99,1%	0,9%		86,4%	8,2%		86,4%	5,4%		70,3%	20,7%		45%	33,7%
															16,3%

Tabellen 12a, b, c, d, e: Ausfall der Schalmprobe bei verschiedenen Lagerungsbedingungen der Milch und bei Zusatz von Konservierungsmitteln.

Erklärung zu Tabellen 12a, b, c, d, e:

D = gleiche Schalmreaktion wie am Tag 0

D Schwächungen der Schalmreaktion um eine Schalmstufe

FD Fehldiagnosen durch Sinken der Schalmreaktion um mehr als eine Schalmstufe gegenüber der Schalmreaktion

+ Schalmwerte höher als +

S Summe.

am Tag 0

Tabelle 12b: Lagerung bei Zimmertemperatur (+20° C bis +22° C) ohne Konservierungsmittel

Schalprobe	Tag 0			Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4		
	D	D		FD	D		FD	D		FD	D		FD	D	
		=	<		=	<		=	<		=	<		=	<
0	69	69			69			69			69			69	
+	30	30			16	14		5	25		1	29			
+	31	16	15		6	23	2	5	1	25	2				
++	27	22	5		9	10	8	4	4	19					
+++	62	36	25	1	11	22	29	10	13	39	6	6			29
++++	67	47	20		23	35	9	8	13	46	1	11			55
S	286	220	65	1	134	104	48	101	56	129	79	50			157
>+	156	105	50	1	43	67	46	22	30	104	7	21			128
>+%	100%	67,2%	32,4%	6,4%	27,5%	43,0%	29,5%	14,3%	19,3%	66,4%	4,5%	13,5%			82,0%

Tabelle 12c: Lagerung bei Zimmertemperatur mit Zusatz von Borsäure (1 : 200)

Schalm- probe	Tag 0			Tag 1			Tag 2			Tag 3			Tag 4		
	D	=	<	D	=	<	D	=	<	D	=	<	D	=	<
0	29	29			29			29			29			29	
+	36	32	4		24	12		19	17		4	32			
+	23	10	10		2	11		2	3	18		4	19		
++	29	20	7		7	6		2	6	21		1	28		
+++	50	31	13		9	25		5	12	33	1	5	44		
++++	66	45	17		12	38		4	21	41	3	16	47		
S	233	167	51		83	92		61	59	113	37	58	138		
7+	145	96	37		28	69		11	39	95	4	22	119		
>+%	100%	66,1%	25,6%		19,3%	47,6%		7,6%	26,9%	65,5%	2,8%	15,2%	82,0%		

Tabelle 12 d: Lagerung bei Zimmertemperatur mit Zusatz von Cialit (1 : 10 000)

Schalm- probe	Tag 0		Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4	
	D	=	D	FD	=	D	FD	=	D	FD
0	32	32			32			32		
+	33	11	22			33			33	
++	12		9	3			12			12
+++	26	1	7	18	1		25			26
++++	46	5	21	20		5	41			46
S	71	3	17	51	1	4	66		2	69
> +	220	52	76	92	34	42	144	32	35	153
> ++	143	9	45	89	2	9	132		2	141
> +++	100%	6,3%	31,6%	62,1%	1,4%	6,3%	92,3%		1,4%	98,6%

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

5.1. Einfluß der Gemelksfraktion

Bei der Probenentnahme im Rahmen der Mastitis-Diagnostik wird es sich nicht immer vermeiden lassen, von verschiedenen Gemelksfraktionen die Proben zu entnehmen. Hier erhebt sich die Frage, ob dann die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse noch gewährleistet ist. Zum anderen interessiert, ob für bestimmte Untersuchungen bestimmten Fraktionen der Vorzug zu geben ist. Bei der vergleichenden Untersuchung des 1., 2., 4. und 8. Strahles sowie des Endgemelks zeigte sich eine geringfügige Abnahme des Epithelzellgehaltes vom 1. bis zum 8. Strahl. Bemerkenswert sind jedoch die niedrigen Leukozytenwerte im 8. Strahl, die in 40% der Fälle die Hälfte und weniger der Leukozytenzahl des 1. Strahls ausmachen. Im Endgemelk ist dagegen mit einer Erhöhung beider Zellanteile zu rechnen.

Die graphischen Darstellungen zeigen, daß hierbei der Leukozytenanteil im Endgemelk stärker als der Epithelzellanteil ansteigt.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse sollte darauf geachtet werden, daß möglichst die ersten Strahlen entnommen werden, da schon im 8. Strahl der geringe Anteil an Leukozyten die Diagnosemöglichkeiten einschränken wird. Wird Endgemelk entnommen, so muß das dem Untersucher zur Kenntnis gebracht werden, da sonst Fehldeutungen leicht möglich sind.

Das Ergebnis der Schalmprobe schwankt innerhalb des Anfangsgemelks höchstens um eine Stufe. Die Schwächung der Schalmreaktion ist dabei immer in Richtung auf den 8. Strahl ausgerichtet. Die Milchproben aus

dem Endgemelk wiesen gegenüber der Reaktion im 1. Strahl des Anfangsgemelks in etwa einem Drittel der Fälle Schalmreaktionen auf, die um mehr als eine Stufe abwichen. Hierbei war fast ausschließlich eine Verstärkung zu beobachten. Auch für die Schalmprobe gilt wie für die Zellzahlbestimmung, daß möglichst die ersten Strahlen zur Untersuchung entnommen werden sollten. Die Untersuchungsergebnisse bei Endgemelken müssen entsprechend vorsichtig bewertet werden.

Vom 1. bis 8. Strahl nimmt die Zahl der nachgewiesenen Mikroorganismen signifikant ab. Beim Endgemelk ist keine weitere nennenswerte Abnahme zu beobachten. Die Bevorzugung der ersten Strahlen wird als zur höchsten Ausbeute an Mastitisserregern führen.

Bei einer Probenentnahme zur Melkzeit sollten die ersten Strahlen des Anfangsgemelkes bevorzugt ermolken werden. Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung und der Schalmprobe führen bei solchen Proben zu für den Gesundheitszustand des Euters repräsentativeren Diagnosen als bei Auswertung des Endgemelks.

In der Praxis eines Eutergesundheitsdienstes wird es nicht immer möglich sein, die Probenentnahme nur zur Melkzeit vorzunehmen. Im Sinne eines rationalen Einsatzes der Probenehmer muß eine Probenentnahme während des gesamten Tages vorgenommen werden. Hierbei ist zu beachten, daß möglichst nicht in unmittelbarem Anschluß an die Melkzeit eine Milch mit Endgemelkscharakter entnommen wird. Im übrigen sollte der Zeitpunkt der Probenentnahme bei der Beurteilung von Untersuchungs-Befunden beachtet werden.

Bei der wissenschaftlichen Definition von Grenzwerten des Zellgehaltes ist auf Grund der vorliegenden Untersuchungen zur Vermeidung von Fehldeutungen zu berücksichtigen, welchen Gemelks-Fractionen die Proben entstammen.

5.2. Probenentnahme mit und ohne Desinfektion der Zitzenspitze

Die Desinfektion der Zitzenspitze soll eine Infektion der Milchprobe mit eutypathogene Keimen, die nur auf der Zitzenoberfläche sitzen, verhindern. Außerdem soll durch diese Maßnahme die Verunreinigung der Milchprobe mit Saprophyten möglichst klein gehalten werden.

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von mit und ohne vorherige Desinfektion entnommenen Milchproben aus 720 Eutervierteln zeigen, daß die Desinfektion für die Diagnose von pathogenen Streptokokken sowie von haemotoxinbildenden Staphylokokken nur von untergeordneter Bedeutung ist. Hinsichtlich der Mikrokokkenbefunde ist ein Einfluß der Desinfektion nachweisbar. Daraus kann geschlossen werden, daß für zahlreiche Mikrokokken die Zitzenoberfläche als Herkunftsort in Frage kommt. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, daß die Mikrokokken zu einem großen Teil in ⁺ Befunden festgestellt wurden. Auf die Fehlerrate bei der Auswertung dieser ⁺ Befunde wird im Vorversuch (siehe 4.2.4.) schon hingewiesen. Außerdem stammen die mit vorangegangener Desinfektion der Zitzenspitze entnommenen Milchproben entsprechend der Versuchsanordnung erst aus dem 4. Strahl. Hierbei könnte sich die Abnahme der Keimzahl innerhalb des Anfangsgemelks, insbesondere im ⁺ Bereich, bemerkbar machen.

Die Versuchsergebnisse deuten somit darauf hin, daß bei der Probenentnahme Mastitisserreger mindestens nicht in nachweisbarer Menge in die Milchproben gelangen. Verunreinigungen der Milchproben, wie sie im Stallmilieu zu erwarten sind, führten bei der Probenentnahme zu kaum feststellbarer Verunreinigung mit unspezifischen Keimen, wenn die Milchprobe innerhalb 10 Stunden einer bakteriologischen Untersuchung zugeführt wird. Dies deckt sich auch mit der Feststellung von GRABER (15), der bei Keimen, die von außen in die Milch gelangten, erst ab 4 - 5 Stunden bei 25° C ein geringes Wachstum beobachtete. Aus dem Vorversuch (siehe 4.2.1.) ergibt sich, daß die Waschung des gesamten Euters in Bezug auf eine Einschränkung der Verschmutzungsmöglichkeiten der Milchprobe von außen unbedeutend ist. Die bakterielle Verunreinigung durch unspezifische Keime tritt erst nach mehr als 10-stündiger Lagerung bei Zimmertemperatur in Milchproben, aber un-

abhängig davon auf, ob bei der Probenentnahme desinfizierende Maßnahmen ergriffen wurden oder nicht. Somit kommt der Desinfektion der Sitzenspitze bei der Probenentnahme keine allzu große Bedeutung hinsichtlich der Treffsicherheit der bakteriologischen Diagnose und der Verunreinigung durch Saprophyten zu.

5.3. Einfluß von Lagerungszeit, Lagerungstemperatur und dem Zusatz von Konservierungsmitteln auf den bakteriologischen Befund und die Schalmprobe.

Bei Kühlschranktemperatur war nach einem Tag weder durch Ausbleiben euterpathogener Keime, noch durch Überwucherung mit unspezifischen Keimen, die Diagnose beeinträchtigt. Am Tag 1 trat in geringem Umfang ein bakterielles Wachstum unspezifischer psychrophiler, beziehungsweise psychrotoleranter Keime ein. Diese Keime traten in Proben der Untersuchungsgruppe II (hämotoxinbildende Staphylokokken) erst nach 3 Tagen auf, während in der Untersuchungsgruppe III (Mikrokokken) die Diagnosestellung innerhalb der fünftägigen Beobachtungszeit durch überwucherndes Wachstum unspezifischer Keime nicht behindert wurde.

Die bei Zimmertemperatur gelagerten Proben zeigten schon am Tag 1 ein starkes unspezifisches Keimwachstum. Nach 48-stündiger Lagerung, am Tag 2, waren die Proben für die bakteriologische Diagnosestellung in der Mehrzahl der Fälle nicht mehr brauchbar.

Von den Konservierungsmitteln übte die Borsäure auf unspezifische Keime zwar eine hemmende Wirkung aus, konnte diese aber in der vorliegenden Konzentration in ihrem Wachstum nicht gänzlich unterdrücken. Von einer Erhöhung der Konzentration wurde abgesehen, da in einigen Fällen schon bei der angewandten Konzentration Streptokokkenbefunde wegen ungenügendem Keimwachstum nicht bestätigt werden konnten.

In Milchproben, die mit Cialit und Merthiolat als Konservierungsmittel versetzt wurde, trat innerhalb der fünftägigen Lagerung bei Zimmertem-

peratur in keinem Fall ein überwucherndes unspezifisches Keimwachstum auf welches die bakteriologische Diagnosestellung nachteilig beeinträchtigt hätte. Dagegen machte sich ab Tag 1 eine Störung des Wachstums der euterpathogenen Mikroorganismen bemerkbar, was bei der angewandten Methode in zunehmender Zahl zu bakteriologisch negativen Befunden führte. Eine Verwendung von Cialit und Merthiolat in der von SCHÖNHERR (58) vorgeschlagenen und hier angewandten Konzentration ist also bedenklich. Formalin erwies sich aus diesem Grund in vorliegende Konzentration als ungeeignet.

Schalmpositive Milchproben, die bei Zimmertemperatur gelagert wurden, ließen ein deutliches Absinken ihrer Reaktionsfreudigkeit bemerken. Der Zusatz von Borsäure blieb darauf ohne Einfluss, dagegen beschleunigte Cialit und Merthiolat den Zerfall des schalmpositiven Systems. Der Zusatz von Formalin machte die Milch für die Schalmprobe unbrauchbar. Die Erhaltung der Reaktionsfreudigkeit der Milch mit dem Schalmreagenz konnte weitgehend bei Lagerung im Kühlschrank gewährleistet werden.

Die Versuche zeigen, daß ein frühzeitiges Kühllagern der Milch, sowohl für die bakteriologische Untersuchung, als auch für die Schalmprobe einer Konservierung der Milch mit Konservierungsmitteln vorzuziehen ist. Ist die Kühlung innerhalb der ersten 10 Stunden nach der Probenentnahme nicht möglich, so sollte nur auf das Konservierungsmittel Borsäure (1 : 200) zurückgegriffen werden, da die übrigen Chemikalien den Zerfall des schalmwirksamen Prinzips fördern.

5. 4. Empfehlungen zur Milchprobenentnahme

Zusammenfassend können für die Entnahme von Milchproben zur Mastitisdiagnostik folgende Empfehlungen gegeben werden:

1. Der Entnahme des Anfangsgemelks sollte der Vorzug gegeben werden. Bei einer Probenentnahme außerhalb der Melkzeit muß bei Auswertung der Untersuchungsergebnisse der zeitliche Abstand von der letzten Melkzeit berücksichtigt werden.

2. Eine melkübliche Reinigung des Euters genügt. Auf Desinfektionsmaßnahmen kann verzichtet werden.
3. Die Milchproben sollten möglichst innerhalb der ersten Stunden soweit wie möglich heruntergekühlt und nach höchstens 10 Stunden in Kühlschranktemperatur verbraucht werden.
4. Bei kühl gelagerten Proben sollte auf den Zusatz von Konservierungsmitteln verzichtet werden. Ist eine Kühlung nicht möglich, so sollte nur auf Borsäure in der Konzentration 1 : 200 zurückgegriffen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

An 2369 Viertelgemelksproben wurde untersucht, inwieweit der Technik sowie dem Zeitpunkt der Milchprobenentnahme, der Lagerungszeit, der Lagerungstemperatur und dem zugesetzten Konservierungsmittel (Borsäure, Cialit, Merthiolat und Formalin) bei der Diagnostik von Euterkrankheiten Bedeutung zukommt.

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Zellgehalt sowie der Grad der Schalmreaktion nehmen in der Regel vom 1. bis zum 8. Strahl geringgradig ab. Im Endgemelk ist ein bemerkenswerter Anstieg zu beobachten.
2. Die Zahl der euterpathogenen Mikroorganismen fällt vom 1. bis zum 8. Strahl beträchtlich. Im Endgemelk werden in den meisten Fällen die geringsten Keimzahlen festgestellt.
3. Innerhalb der Zwischenmelkzeit unterliegen Keim- und Zellzahl sowie das Ergebnis der Schalmprobe Schwankungen, welche keine Regelmäßigkeit erkennen lassen.
4. Die Reinigung und Desinfektion der Zitzenspitze vor der Probenentnahme hat für die Feststellung euterpathogener Mikroorganismen in der Milchprobe keine Bedeutung.
5. Konservierungsmittel wie Borsäure (1 : 200), Cialit (1 : 10 000) und Merthiolat (1 : 25 000) hemmen zwar mehr oder weniger das unspezifische Keimwachstum in der Milchprobe, gefährden aber den Nachweis euterpathogener Mikroorganismen. Formalin (1 : 1 000) scheidet als Konservierungsmittel in der angewandten Verdünnung aus.
6. Der Zerfall des schalmwirksamen Systems wird bei Zimmertemperatur durch das Konservierungsmittel Borsäure (1 : 200) nicht aufgehalten, durch den Zusatz von Cialit, Merthiolat und Formalin aber beschleunigt.

6. SUMMARY

2 369 quarter samples have been investigated to see in what respect importance attributes to the technique, also to the time of milk sample-taking, to the time of storage, to the temperature of storage, and to the added preservations (boric acid, cialit, methiolat and formalin) in the diagnoses of mastitis.

The experiments resulted to the following:

- 1) The cell count as well as the degree of the Schalm-reaction decreases from the first to the eight stream in an insignificant way as a rule. In the stripping a remarkable increase is to observe.
- 2) The number of udder pathogene micro-organisms is considerably falling from the first to the eight stream. In most cases in the stripping the lowest germ counts were to be made out.
- 3) Within the intervening milking time the cell counts as well as the result of the Schalm-test is subjekt to fluctuations which do not indicate any regularity.
- 4) Cleaning and disinfection of the teat-tip before sampletaking are not important for the ascertainment of udder pathogene micro-organisms in the milk sample.
- 5) Indeed preservations as boric (1 : 200), cialit (1 : 10 000), and merthiolat (1 : 25 000) are blocking more or less the unspecific growth of germination in the milk sample, but they endanger the proof of udder pathogene micro-organisms. Formalin (1 : 1 000) must fall away as a preservation in the practical dilution.
- 6) In normal room temperature the decay of the Schalm-active system is not to stop by the preservation with boric acid (1 : 200), but the decay is to accelerate by the admixture of cialit, merthiolat and formalin.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Baier, W.: Der Schalm-Mastitis-Test in der planäßigen Euterkontrolle.
Wiener Tierärztl. Monatsschrift 51 (1964) 11.
2. Baier, W. und Leidl, W.: Untersuchungen über Korrelationen zwischen Laktationsstadium, bakteriellem Befund der Milch und SMT-Reaktion.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77 (1964) 217.
3. Becht, H.: Vorschlag zur Mastitis-Diagnostik.
Schw. Arch. f. Tierheilk. 103 (1961) 627.
4. Brodauf, H.: Über die Wechselbeziehung von Milchleistung und Mastitisanfälligkeit.
Züchtungsk. 35 (1963) 8.
5. Carroll, E. J. und Schalm, O. W.: Effect of desoxyribonuclease on the california test of mastitis.
J. Dairy Sci. 45 (1962) 1094.
6. Christ, W.: Über das Reaktionsvermögen von Proteinen mit synthetischen Netzmitteln als Grundlage zum besseren Verständnis des California-Mastitis-Testes.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 69 (1962) 108.
7. Cullen, G.A.: The use of electronic counters for determining the number of cells in milk.
The Vet. Record 77 (1965) 858.
8. Dedić, K.: Erfahrungen mit der California-Mastitis-Probe.
Tierärztl. Umsch. 15 (1960) 153.

9. Dedić, K. und Kielwein, G.:
Alkarylverbindungen als Reagenz zur Ermittlung von Sekretionsstörungen des Euters beim Rind.
Mh. Tierheilk. 12 Sonderteil:
Rindertuberkulose und Brucellose 9 (1960) 19 und 35.
10. Diernhofer, K.:
Diagnostik der Euterentzündungen.
Wiener Tierärztl. Monatsschrift 37 (1950) 809.
11. Dittmar, H. J.:
Über das Vorkommen coliformer Keime an der Zitze, im Strichkanal und in der Zisterne.
Vet. Diss., Hannover 1956.
12. Ernst, W.:
Über Milchstreptokokken und Streptokokken-Mastitis.
Arch. Tierheilkunde 21 55 (1910).
13. Frank, W.:
Betrachtungen zum Mastitisproblem aus der Sicht des Eutergesundheitsdienstes.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 14 (1963) 177.
14. Gadiant, C. M.:
Das Verhalten von Keim- und Zellgehalt infizierter Euterviertel im Verlaufe einer Zwischenmelkzeit.
Vet. Diss. Bern 1954.
15. Graber, H.:
Die Bedeutung der Euterinfektion und der Melkkontamination für die Keimzahl und die Haltbarkeit der Milch.
Vet. Diss. Bern 1954.
16. Harr, M.:
Ein Beitrag zur Ermittlung euterkranker Bestände durch die Untersuchung von Kannenmilchproben.
Vet. Diss. Gießen 1965.

17. Hauke, H.: Zellgehalt der normalen und pathologisch veränderten Milch.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 68 (1961) 660.

18. Hawker, E. L., Linton, A. H., Folkes, B. F. und Carlile, M. J.: Einführung in die Biologie der Mikroorganismen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

19. Heidrich, H. J., Mülling, M. und Birkner, H. W.: Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an durch Handmelken und durch Ventilenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77 (1964) 85.

20. Heidrich, H. J. und Renk, W.: Krankheiten der Milchdrüse bei Haustieren.
Verlag P. Parey 1963.

21. Ibrahim, G., Abo-Elnaga und Kandler, O.: Zur Verbreitung der Staphylokokken in der Milch.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 16 (1965) 132.

22. Jaartsveld, F. H. J.: Bijdrage tot de diagnostiek van mastitis bij runderen in het kader van een georganiseerde bestrijding.
Vet. Diss. Utrecht 1961.

23. Jenrich, R.: Untersuchungen über die Bedeutung der bakteriellen Infektion beim Euterkatarrh des Rindes im Württembergischen Oberland.
Vet. Diss. Gießen 1966.

24. Kästli, P.: Untersuchungen über den Euterkatarrh der Milchkühe.
Schweiz. Arch. Tierheilk. Bd. 98 (1951) 364.

25. Kästli, P.: Der Euterkatarrh.
Verb. Druckerei A. G. Bern 1943.
26. Kästli, P.: Diskussionsbeitrag anlässlich der 10. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 13. bis 15. Oktober 1966 in Lindau.
27. Kästli, P. und Binz, M.: Die Bedeutung der Euterinfektion für die Entstehung von katarrhalischen Sekretionsstörungen (Euterkatarrhen) bei der Milchkuh. Schw. Arch. f. Tierheilk. 90 (1948) 349.
28. Kandler, O.: Zur Definition der "psychrophilen" Bakterien. Milchwissensch. 21 (1966) 257.
29. Kessler, E. M., Reid, J. J., Knodt, C. B.: Selection of samles in determination of streptococcal flora of the udder. J. Dairy Sci. 33 (1950) 676.
30. Kielwein, G.: Mündliche Mitteilung
31. Kielwein, G.: Diskussionsbemerkungen beim Rundtischgespräch der Stuttgarter Tierärztlichen Gesellschaft über Mastitisfragen am 20. und 21. April in Bad Waldsee (1964).
32. Kielwein, G. und Harr, M.: Ein Beitrag zur Therapie der chronischen Rindermastitis. Tierärztl. Umsch. 20 (1965) 363.
33. Kitt, Th.: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie. 7. Auflage, Verlag Enke Stuttgart 1957.

34. Klimmer, M. und Haupt, H.:
Zur Frage der Übertragung der Streptokokken-mastitis durch die Melkmaschinen Alfa und Westfalia.
Milchw. Forschungs. 9 (1930) 511.
35. Krüger, G.:
Die Methodik der Marken- und Vorzugsmilchüberwachung im Rahmen des Rindergesundheitsdienstes.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 13 (1962) 65.
36. Leidl, W. und Schalm, O. W.:
Die Anwendung des Schalm-Mastitis-Testes (SMT) bei Sammelmilch zur Bestimmung minderwertiger Milch, bedingt durch hohen Zellgehalt.
Tierärztl. Umschau 16 (1961) 219.
37. Leidl, W., Schalm, O. W., Krieger, A. und Lagemann, H.:
Vergleich des Schalm-Mastitis-Testes mit dem Zellgehalt, der Katalase-Thybroprobe und dem Chlorgehalt in der Milch.
I. Vergleich des Schalm-Mastitis-Testes mit dem Zellgehalt.
Berl., Münch. Wschr. 74 (1961) 382.
38. Leidl, W., Schalm, O. W. und Lüps, P.:
Die Zellbestimmung in der Milch nach Prescott und Breed und ihre Fehlermöglichkeiten.
Milchwissenschaft. 16 (1961) 555.
39. Little, R. B., Wayne, N. und Plastringe, W. N.:
Bovine Mastitis.
Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York and London 1946.

40. Matschullat, G.: Die Brabanter Mastitis-Reaktion, ein neues Verfahren zur Ermittlung von Sekretionsstörungen des Euters durch Kannenmilchuntersuchungen.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 14 (1963) 32.
41. Meeder, K.: Versuch über die bakterizide Wirkung von Rohmilch an gesunden, nicht infizierten Eutern.
Vet. Diss. München 1964.
42. Meyn, A. und Gedek, W.: Zur Differenzierung von Streptococcus agalactiae mit Hilfe des CAMP-Testes.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 75 (1962) 281.
43. Negretti, F.: La prova all'antiformina nella diagnosi della mastite bovina.
Atti Soc. ital. Sci. vet. 12 (1958) 654.
44. Neundorf, R. und Brabant, W.: Zur Diagnose und Therapie der Mastitis des Rindes im Blickpunkt genossenschaftlicher Viehhaltung.
Mh. Vet.-Med. 16 (1961) 641.
45. Obiger, G.: Zelldifferenzierung als Hilfsmittel für die Diagnose von Sekretionsstörungen und Mastitiden.
Milchwissenschaft 15 (1960) 500.
46. Obiger, G.: Bewertung von Staphylokokken in der Milch.
Milchwissensch. 15 (1960) 107.
47. Obiger, G.: Warum ist der Schalmtest kein zuverlässiges Mastitis-Diagnostikum? Versuch einer Deutung seines Wirkungsmechanismus.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 12 (1961) 226.

48. Obiger, G.: Reichweite und Bedeutung der sog. Schnellmethoden sowie weiterer Laboratoriumsuntersuchungen zur Feststellung von Euterentzündungen. Kieler Milchw. Forschungsb. 13 (1961) 293.
49. Obiger, G.: Mastitisdiagnose. Kieler Milchw. Forschungsb. 14 (1962) 307.
50. Obiger, G.: Zur Frage der milchhygienischen Bedeutung der Staphylokokken. Arch. f. Lebensmittelhyg. 14 (1963) 265.
51. Phipps, L. W. und Newbould, F. H. S.: Isolation and Electronic Counting of Leucocytes in Cows-Milk. The Vet. Record 77 (1965) 1377.
52. Renk, W.: Pathogenese der durch Staphylokokken hervorgerufenen Euterentzündungen. Berl. Münch. Wschr. 74 (1961) 1.
53. Rüttimann, G.: Untersuchungen über die Bedeutung des Zellgehaltes der Milch für die Bakterienvermehrung. Vet. Diss. Bern 1964.
54. Russel, H. L. und Hoffmann, K.: Die Verbreitung von Zellelementen in der Milch und deren Beziehung zu gesundheitlichen Normalmassen. 24. Jahresbericht d. landw. Versuchsstation der Universität Wiskonsin Ref.: Milchwirtschaftl. Zbl. 4 (1908) 409.
55. Schalm, O. W.: Ein neuer Mastitis-Test. Tierärztl. Umsch. 15 (1960) 151.

56. Schalm, O. W. und Norlander, F.:
Experiments and observations leading to
development of California-mastitis-test.
J. Amer. vet. med. Ass. 130 (1957) 199.
57. Schalm, O. W. und Lasmanis, J.:
Distribution of micrococci and other bacteria
in milk samples from a single dairy herd
after twelve years of mastitis control.
Amer. J. vet Res. 18 (1957) 778.
58. Schönherr, W.:
Standartmethoden der tierärztlichen Milch-
untersuchung.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1960.
59. Schönherr, W.:
Tierärztliche Milchuntersuchung.
Verlag S. Hirscl Leipzig 1965.
60. Schober, R., Christ, W. und Prinz, J.:
Untersuchungen zur California-Mastitis-Reaktion.
Milchwissenschaft 18 (1963) 620.
61. Schreiner, A.:
Milchuntersuchungen in Vorzugsmilchbeständen.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 13 (1962) 32.
62. Seelemann, M.:
Die Streptokokkeninfektion des Euters insbe-
sondere der Gelbe Galt.
Verlag v. M. u. H. Schaper Hannover 1932.
63. Seelemann, M.:
Biologie der bei Tieren und Menschen vor-
kommenden Streptokokken.
Verlag Hans Carl, Nürnberg 2. Aufl.
64. Seelemann, M.:
Mastitis-Probleme.
Mh. Tierheilk. 14 I. Teil 233, II. Teil 287
(1962).

65. Seelemann, M.: Über den Zellgehalt der Milch, seine Feststellung, Bedeutung und Beurteilung. Milchwissenschaft 19 (1964) 182.
66. Seelemann, M.
Jaeven. Über einige Verfahren zur Feststellung des Zellgehaltes in der Milch und ihrem Wert für die Diagnose von Sekretionsstörungen. Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsab. 15 (1963) 179.
67. Seelemann, M. und Obiger, G.: CAMP-Test und TKT-Medium, ihre Bedeutung für die Galt diagnose und Galt bekämpfung. Milchwissenschaft 11 (1956) 98 und 34.
68. Seelemann, M. und Obiger, G.: Symposium der Fachgemeinschaft Milchhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsab. 14 (1962) 265.
69. Stableforth, A. W.: Die Mastitiden der Rinder mit besonderer Berücksichtigung der Bekämpfung *Streptococcus agalactiae*. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 57 (1950) 253.
70. Steck, W.: Die latente Infektion der Milchdrüse. Verlag M. und H. Schaper, Hannover 1930.
71. Steck, W.: Die Tilgung des Gelben Galt es. Verlag P. Haupt, Bern-Leipzig 1939.
72. Tilgner, K., Schierholz, H. und Jeder, R.: Erfahrungen mit der CAMP-Platte. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 68 (1955) 277.

73. Tolle, A., Zeidler, H. und Heeschen, W.:
Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von
Milchzellen.
Milchwissenschaft 21 (1966) 93.
74. Trommsdorff, R.:
Zur Leukozyten- und Streptokokken-Frage der
Milch.
Berl. Tierärztl. Wschr. 80 (1909).
75. Worseck, M.:
Staphylokokken als Ursache von Lebensmittel-
vergiftungen und eigene Untersuchungen über
die Toxidität von Mastitis-Staphylokokken.
Arch. f. Lebensmittelhyg. 7 (1956) 145.
76. Zeidler, H.:
Definition der Mastitis und ein Verfahren zur
gezielten Kontrolle. Vortrag anlässlich der
10. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebens-
mittelhyg. vom 13. bis 15. Oktober 1966 in
Lindau.

Dem Vorstand des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungs-
amtes Aulendorf, Herrn Professor Dr. Dedié, danke ich für
die Überlassung des Themas, für großzügige Unterstützung
und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem
Institut.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter des Milchlaboratoriums,
Herrn Veterinärarzt Dr. Kielwein, der mir bei der Durchführung
der Arbeit mit Anleitung und Rat stets eine wertvolle Hilfe war.

Den Mitarbeitern im Milchlaboratorium danke ich für ihre
Mithilfe bei den Untersuchungen.

LEBENS LAUF

Am 1. August 1939 wurde ich, Peter Mühlhäusler, als erster Sohn des Werbefachmanns Hans Mühlhäusler und seiner Ehefrau Annemarie Mühlhäusler geb. Kessler in Chemnitz/Sachsen geboren.

Kriegsereignisse zwangen meine Eltern 1945 nach Tübingen zu ziehen. Dort besuchte ich zunächst die Walddorf-Schule und im Zuge eines Wohnungswechsels nach Tübingen-Lustnau 4 Jahre die Volksschule in Lustnau.

Anschließend besuchte ich bis 1958 das Kepler-Gymnasium in Tübingen und bis Frühjahr 1960 das Progymnasium in Metzingen, das ich am 5. März 1960 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Vom Wintersemester 1960/61 bis zum Sommersemester 1963 war ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität München immatrikuliert. Das 6. Semester studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule in Wien und die letzten 3 Semester wieder in München, wo ich am 29. September 1965 die tierärztliche Prüfung ablegte.

Nach Ableistung meiner Praktikantenzeit erhielt ich mit Geltung vom 16. April 1966 die Approbation als Tierarzt. Seitdem arbeite ich im Milchlabor des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes in Aulendorf.

